



**Catarina da Silva
Oliveira**

**Clonagem e caracterização de genes de sintetase da
quitina em *Botryosphaeria* spp.**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica do Prof. Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves, Professor Auxiliar Convidado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Prof. Dra. Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha
professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Dra. Susana Rodriguez Echeverria
professora auxiliar convidada do Departamento de Botânica da Universidade de Coimbra

Prof. Dr. Artur Jorge da Costa Peixoto Alves
professor auxiliar convidado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Quero expressar um agradecimento especial ao meu orientador, Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, a orientação técnico-científica, o apoio, a motivação, os ensinamentos transmitidos e o tempo dispendido desde o início das actividades experimentais até à revisão da presente dissertação. O meu sincero e profundo obrigada.

Aos colegas do laboratório de produção de componentes, Centro Regional de Sangue de Coimbra, pelo apoio, compreensão e incentivos ao longo desta jornada.

À Marisa e Patrícia pela amizade, compreensão, paciência e grande apoio nas horas de desespero.

Aos meus amigos, que desde sempre me incentivaram a alcançar este objectivo.

Finalmente, o meu reconhecimento e a dedicação deste trabalho aos meus pais e irmãos pelo estímulo, apoio permanentes e pelo esforço e sacrifícios de uma vida inteira.

palavras-chave

***Botryosphaeria*, sintetase de quitina, filogenia**

resumo

Botryosphaeria é um género bem conhecido devido às espécies que causam doenças numa grande diversidade de plantas economicamente importantes. Este género é actualmente composto de duas espécies, *Botryosphaeria dothidea* e *Botryosphaeria corticis*.

A parede celular é essencial à sobrevivência dos fungos, fornecendo protecção contra danos mecânicos e resistência à pressão interna. Dada à sua importância vital e natureza química, é alvo para acção de drogas antifúngicas. Como em todos os fungos, a quitina também faz parte da constituição da parede celular do género em estudo, sendo um polímero estrutural importante para a manutenção da forma e rigidez da parede, bem como na formação de septos. Vários genes que codificam diferentes isoformas de sintetases da quitina fúngicas foram já clonados e caracterizados. A partir de DNA genómico de *B. dothidea* CBS115476 e *B. corticis* CBS119047 foram amplificados, por PCR, fragmentos de genes de sintetase da quitina os quais foram, posteriormente, clonados e sequenciados. A análise das sequências nucleotídicas e sequências de aminoácidos deduzidas dos 17 clones revelou a existência de três classes distintas de CHS (I, II e III).

A análise filogenética dessas sequências permitiu estabelecer algumas relações filogenéticas entre espécies de *Botryosphaeria* e outros fungos registados no GenBank. Em todas as análises filogenéticas verificou-se que as duas espécies de *Botryosphaeria* agrupam num ramo distinto. A análise de sequências de CHS de classe II e III permitiu ainda uma distinção entre as espécies *B. dothidea* e *B. corticis*, revelando potencial como marcadores filogenéticos ao nível da espécie. As sequências de CHS classe I não permitiram uma distinção clara entre ambas as espécies.

Por hibridação pretendeu-se detectar fragmentos homólogos ao gene de sintetase da quitina em quatro estirpes de *Botryosphaeria*, sendo as sondas 3 clones sequenciados anteriormente, cada um pertencente a uma classe de sintetase da quitina (I, II e III). Após hibridação, foram detectados fragmentos *HindIII* em todas as estirpes testadas, para as três classes de sondas. Tal facto indica a presença de sequências homólogas do gene que codifica para a sintetase da quitina nos genomas das quatro estirpes. A detecção de um só fragmento por cada uma das classes sugere que estes genes são de cópia única. No entanto, a sequenciação de diversos clones revelou a existência de variantes moleculares em duas das classes.

keywords

***Botryosphaeria*, chitin synthase, phylogeny**

abstract

The genus *Botryosphaeria* is well known by the species that cause disease in a wide range of plant hosts economically important. This genus is currently composed of two species, *Botryosphaeria dothidea* and *Botryosphaeria corticis*.

Integrity of cell walls is essential to survival of fungi, providing protection against mechanical damage and resistance to internal pressure. Because of the vital importance and chemical nature of fungal walls, they represent a target for the action of antifungal drugs. Chitin is a basic structural polymer, important for maintenance of cell form and walls rigidity, and to the formation of septa. Several genes coding specific chitin synthase isoforms have been cloned and characterized. From *B. dothidea* CBS115476 and *B. corticis* CBS119047 genomic DNA we amplified by PCR chitin synthase gene fragments, which were then cloned and sequenced. Analysis of the nucleotide and deduced amino acid sequences of 17 clones revealed three distinct classes of CHS (I, II and III).

Phylogenetic analysis of these sequences allowed the establishment of phylogenetic relationships between species of *Botryosphaeria* and other fungi registered in the GenBank. In all phylogenetic analysis it was shown that the two species of *Botryosphaeria* grouped in a separate clade.

Analysis of the CHS sequences from classes II and III allowed a distinction between the species *B. dothidea* and *B. corticis*, showing potential as a phylogenetic markers at the species level. The chitin synthase sequences from classe I did not allow a clear distinction between the two species.

In hybridization experiments and using as probes three clones that were previously sequenced, each belonging to a distinct class of chitin synthase (I, II and III), chitin synthase gene fragments were detected in four *Botryosphaeria* strains. After hybridization, *HindIII* fragments were detected in all strains tested, for the three classes of probes. This indicates the presence of the gene sequences that encode chitin synthases in the four strains. The detection of a single fragment for each of the classes suggests that these genes are the single copy genes. However, the sequencing of multiple clones revealed the existence of molecular variants in two of the classes.

Índice

LISTAGEM DE FIGURAS.....	III
LISTAGEM DE TABELAS.....	VI
LISTAGEM DE ABREVIATURAS.....	VII
1. Introdução.....	1
1.1 <i>Botryosphaeria</i> , o género.....	2
1.2 Quitina.....	3
1.3 Biossíntese da quitina.....	5
1.4 Sintetase da quitina.....	7
1.5 Inibição do metabolismo da quitina.....	9
1.6 Objectivos do estudo.....	9
2. Material e Métodos.....	10
2.1 Estirpes.....	11
2.2 Conservação dos microrganismos.....	11
2.2.1 Aditivos para meios de cultura.....	11
2.3 Extracção de DNA.....	12
2.4 Amplificação por PCR.....	13
2.5 Clonagem.....	14
2.5.1 Ligação de fragmentos de DNA.....	15
2.5.2 Transformação de células competentes de <i>E. coli</i>	15
2.6 Amplificação dos clones por PCR.....	17
2.7 Digestão de DNA com endonucleases de restrição.....	18
2.8 Determinação da sequência nucleotídica.....	18
2.9 Análise computacional.....	18
2.10 Marcação e Hibridação.....	19
2.10.1 Marcação por PCR.....	19
2.10.2 Digestão de DNA genómico com endonucleases de restrição.....	20
2.10.3 Transferência para membrana de nylon.....	21
2.10.4 Hibridação.....	22
2.10.5 Detecção colorimétrica com NBT e BCIP.....	23

3. Resultados.....	25
3.1 Amplificação por PCR.....	26
3.2 Clonagem, transformação.....	26
3.3 Amplificação dos clones por PCR.....	27
3.4 Digestão de DNA com endonucleases de restrição.....	28
3.5 Análise das sequências nucleotídicas e de aminoácidos.....	30
3.6 Alinhamento de sequências.....	38
3.6.1 Alinhamento de sequências de aminoácidos.....	38
3.6.2 Alinhamento das sequências por classes.....	44
3.7 Análise filogenética.....	50
3.8 Hibridação.....	54
4. Discussão.....	55
5. Conclusões.....	60
6. Bibliografia.....	62

LISTAGEM DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura primária da quitina onde n é o grau de polimerização (adaptado de Cohen, 2001).....	4
Figura 2. Representação esquemática das estruturas polimórficas da quitina. (adaptado de Campana-Filho <i>et al.</i> , 2007).....	4
Figura 3. Eventos associados à formação e deposição da quitina. (?) = Mecanismo desconhecido (adaptado de Cohen, 2001).....	6
Figura 4. Organização das subunidades de sintetase da quitina classe II (adaptado de www.mpibp-frankfurt.mpg.de/terwisscha/).....	7
Figura 5. Mapa do vector de <i>E. coli</i> pCR [®] 2.1, para clonagem de fragmentos de DNA obtidos por PCR.....	14
Figura 6. Esquema de hibridação com sondas não radioactivas (adaptado de http://www.ufv.br/dfp/virologia/FIP704_teor_files/Semanas_7_e_8_Diagnose_molecular_de_fitopatogenos.pdf).....	19
Figura 7. Produto de amplificação por PCR de um fragmento que codifica para a sintetase da quitina, após electroforese em gel de agarose a 1,5%.....	26
Figura 8. Colónias brancas e azuis resultantes do crescimento em meio selectivo de <i>E.coli</i> transformada com um vector com selecção pelo <i>LacZ</i> (adaptado de Alves e tal., 2003).....	27
Figura 9. Electroforese em gel de agarose a 1% da amplificação por PCR de 20 clones da amostra CBS115476, usando os “primers” T7 “promoter” e M13 “reverse primer” do vector pCR [®] 2.1.....	28

Figura 10. Electroforese em gel de agarose a 1% da amplificação por PCR de 20 clones da amostra CBS119047, usando os “primers” T7 “promoter” e M13 “reverse primer” do vector pCR [®] 2.1.....	28
Figura 11. Produto da reacção de digestão de 29 clones com a enzima <i>Hae</i> III, seguida de electroforese em gel de agarose a 2%	29
Figura 12. Sequências nucleotídicas e sequências de a.a. deduzidas dos fragmentos do gene que codifica para a sintetase da quitina em <i>B. dothidea</i> e <i>B. corticis</i>	37
Figura 13. Alinhamento das sequências de a.a. deduzidas dos fragmentos de sintetase da quitina de diferentes espécies de fungos, com os vários clones de <i>Botryosphaeria</i> spp.....	42
Figura 14. Dendrograma que mostra as diferentes classes de sintetase da quitina.....	43
Figura 15. Alinhamento das sequências nucleotídicas dos fragmentos do gene de sintetase da quitina das duas estirpes de <i>Botryosphaeria</i>	48
Figura 16. Alinhamento das sequências de a.a. deduzidas dos fragmentos do gene de sintetase da quitina das duas estirpes de <i>Botryosphaeria</i>	49
Figura 17. Árvore filogenética derivada das sequências de nucleótidos de fragmentos de sintetase da quitina de classe I de diferentes espécies de fungos e dos fragmentos de <i>B. dothidea</i> e <i>B. corticis</i> de classe I.....	51
Figura 18. Árvore filogenética derivada das sequências de nucleótidos de fragmentos de sintetase da quitina de classe II de diferentes espécies de fungos e dos fragmentos de <i>B. dothidea</i> e <i>B. corticis</i> de classe II.....	52

Figura 19. Árvore filogenética derivada das sequências de nucleótidos de fragmentos de sintetase da quitina de classe III de diferentes espécies de fungos e dos fragmentos de *B. dothidea* e *B. corticis* de classe III.....53

Figura 20. Detecção por hibridação de fragmentos homólogos do gene que codifica para sintetase da quitina de classe I, II e III.....54

LISTAGEM DE TABELAS

Tabela I: Lista das espécies de fungos e respectivos genes de sintetase de quitina utilizados no alinhamento de sequências de aminoácidos.....	38
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Deoxiadenosina
a.a.	Aminoácido
Ap	Ampicilina
ATP	Adenosina tri-fosfato
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BLAST	Basic local alignment search tool
CHS	Sintetase da quitina
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
cm	Centímetro
cm²	Centímetro quadrado
dATP	Desoxiadenosina-5'-trifosfato
dCTP	Desoxicitidina-5'-trifosfato
dGTP	Desoxiguanidina-5'-trifosfato
DIG	Digoxigenina
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfatados
dsDNA	DNA de cadeia dupla
dTTP	Desoxitimidina-5'-trifosfato
dUTP	Desoxiuridina-5'-trifosfato
et al.	E colaboradores
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EtBr	Brometo de etídeo
g	Grama
GluNac	N-acetil-β-D- glucosamina
H₂O	Água
h	Hora(s)
HCl	Ácido clorídrico
IPTG	Isopropil-b-D-galactopiranosídeo
l	Litro

min.	Minuto(s)
M	Molar
Mg²⁺	Ião magnésio
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mbar	Milibar
mM	Milimolar
mg	Miligrama
ml	Mililitro
N	Normal
nº	Número
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NBT	“Nitroblue tetrazolium salt”
Ng	Nanograma
Pb	Pares de bases
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
ph	Potencial de hidrogénio iónico
pmol	Picomol
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
seg.	Segundo(s)
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SSC	Citrato de sódio salino
T	Deoxitimidina
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U	Unidades de enzima
UV	Ultravioleta
X-Gal	5-bromo-4-cloro-indol-b-Dgalactopiranosídeo
®	Marca registada

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
°C	Graus Célcus

1. Introdução

1.1 *Botryosphaeria*, o género

Botryosphaeria (Botryosphaeriaceae, Botryosphaeriales, Ascomycota) é um género que apresenta uma distribuição cosmopolita, ou seja, ocorre num vasto número de hospedeiros (monocotiledóneas, dicotiledóneas, gimnospérmicas, angiospérmicas, caules e hastes de gramíneas), ostentando uma ampla distribuição geográfica (Crous *et al.*, 2006; Úrbez-Torres *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2007).

O género inclui espécies patogénicas, saprófitas e endófitas. Desde que foi introduzido (1863), várias espécies têm sido identificadas como agentes causadores de doenças em diversas plantas lenhosas economicamente importantes (Crous *et al.*, 2006; Slippers and Wingfield, 2007); demonstra-se lenhínolítico, produzindo enzimas que degradam a parede celular lenhificada de plantas (Barbosa *et al.*, 2003).

O cancro de *Botryosphaeria* é uma das doenças mais relevantes de *Eucalyptus* spp. na África do Sul. Na Austrália, *Botryosphaeria* spp. é considerada uma ameaça significativa para a produção e sustentabilidade das plantações de *Eucalyptus*, sobretudo devido ao aumento da uniformidade genética das plantas (Arruda *et al.*, 1998). Em Portugal, as doenças mais importantes são o cancro e o “dieback” do sobreiro (*B. corticola*), o “dieback” e podridão da uva na videira (*B. parva*, *B. stevensii*, *B. obtusa*), a podridão negra da maçã (*B. obtusa*), podridão branca da maçã (*B. stevensii*), “dieback” e podridão da azeitona (*B. obtusa*, *B. dothidea*) e “blight” do pinheiro (*D. pinea*) (Marchi *et al.*, 2006). No entanto, o conhecimento limitado acerca da patogénese de *Botryosphaeria* spp. e dos factores que afectam o seu desenvolvimento têm dificultado o desenvolvimento de estratégias específicas para o controlo da doença (Marchi *et al.*, 2006).

A identificação ao nível da espécie no género *Botryosphaeria* é complicada em vários aspectos. A diversidade morfológica entre teleomorfos (formas sexuadas) é insuficiente para permitir identificação ao nível da espécie, pois estes são raros na natureza e a sua morfologia não apresenta grandes diferenças, assim, a taxonomia do género e a diferenciação das espécies baseia-se, sobretudo, nos anamorfos (formas assexuadas), a forma mais comum de *Botryosphaeria*, cuja morfologia é muito variada (Alves *et al.*, 2007; Saldanha *et al.*, 2007).

A identificação das espécies baseia-se em características morfológicas dos conídios, como tamanho, forma, cor, septação, espessura e textura da parede. Contudo, algumas características dos anamorfos podem apresentar extensiva plasticidade. As características

morfológicas podem, ainda, ser influenciadas pelo substrato em que cada fungo se desenvolve. Além disso, uma única espécie é capaz de colonizar um vasto número de hospedeiros (Alves *et al.*, 2007).

Recentemente, Crous e seus colaboradores (2006) demonstraram que o género *Botryosphaeria* é composto por linhagens filogeneticamente distintas e que podem ser definidas de acordo com os seus géneros anamórficos. Assim, a taxonomia deste grupo de fungos foi revista e o género *Botryosphaeria* é actualmente composto de apenas duas espécies *B. dothidea* (espécie tipo) e *B. corticis* (Alves *et al.*, 2007).

1.2 Quitina

A parede celular dos fungos é uma estrutura dinâmica com grande plasticidade que protege a célula de variações de pressão osmótica e outros stresses ambientais. Baseado em vários estudos, a parede celular dos fungos é, essencialmente, composta por glucanas, mananas, glicoproteínas e quitina (Bowman and Free, 2006; Campana-Filho *et al.*, 2007; Pontón, 2008). Dada a sua localização, a parede celular constitui o primeiro local de contacto com o hospedeiro, desempenhando um papel fundamental na acção patogénica (Pontón, 2008).

A quitina é um polímero linear de N-acetil- β -D- glucosamina (GluNac), formado por resíduos de N-acetilglucosamina ligados entre si por ligações β -(1-4)-glicosídicas, conferindo-lhe uma rigidez estrutural. Os polímeros de quitina tendem a formar microfibrilhas de aproximadamente 3nm de diâmetro, estabilizadas por ligações de hidrogénio entre os grupos amina e carboxilo (Fig. 1) (Merzendorfer and Zimoch, 2003; Bowman and Free, 2006; Campana-Filho *et al.*, 2007).

Alguns autores consideram que a quitina é um derivado da celulose devido à grande semelhança molecular entre os dois polímeros (Merzendorfer *et al.*, 2006).

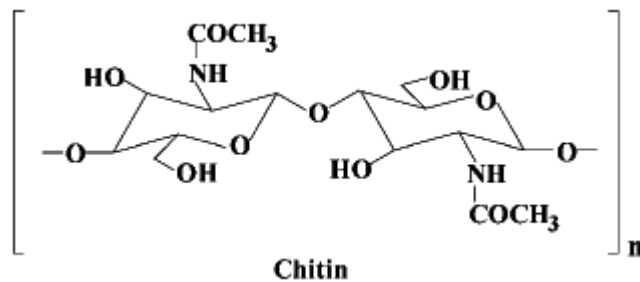


Figura 1. Estrutura primária da quitina onde n é o grau de polimerização (adaptado de Cohen, 2001).

A quitina encontra-se na matriz da estrutura esquelética de invertebrados, como artrópodes, anelídeos, moluscos, celenterados, em algas diatomáceas, também nas paredes celulares de fungos como ascomicetos, zigomicetos e basidiomicetos. No entanto é inexistente em vertebrados (Campana-Filho *et al.*, 2007; Martín-Urdíroz *et al.*, 2008). Representa cerca de 1-2% do peso seco da parede celular das leveduras e em fungos filamentosos, como *Neurospora* e *Aspergillus*, pode chegar a 10-20% (Bowman and Free, 2006).

Este polímero é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, sendo superado apenas pela celulose. A taxa de reposição da quitina chega a ser duas vezes maior que a da celulose (Campana-Filho *et al.*, 2007).

Em função do organismo considerado, mas também do papel que desempenha, a quitina adota estruturas polimórficas denominadas α -, β -, γ -quitina (Merzendorfer, 2006). Os polimorfismos de quitina correspondem a diferentes arranjos no estado sólido, decorrentes de deposições distintas das cadeias do polímero nas lamelas que constituem os domínios cristalinos (Fig. 2) (Merzendorfer and Zimoch, 2003; Campana-Filho *et al.*, 2007).

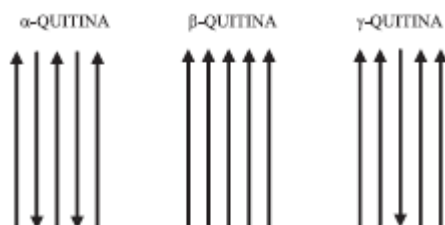


Figura 2. Representação esquemática das estruturas polimórficas da quitina, sendo que as setas representam as cadeias poliméricas no sentido terminal não-redutor para o redutor (adaptado de Campana-Filho *et al.*, 2007).

Na α -quitina, todas as cadeias poliméricas exibem uma orientação anti-paralela, o que favorece a existência de numerosas ligações de hidrogénio inter- e intra-cadeias da mesma lamela ou lamelas vizinhas. No caso da forma β -, as cadeias pertencentes a diferentes lamelas dispõem-se paralelamente, dificultando o estabelecimento de ligações de hidrogénio intermoleculares. Na γ -quitina parece ocorrer uma combinação dos dois arranjos anteriormente descritos. Esta estrutura é a menos estudada e conhecida. Sugere-se que possa ser uma distorção das duas estruturas anteriores (Merzendorfer and Zimoch, 2003; Campana-Filho *et al.*, 2007).

1.3 Biossíntese da quitina

A formação da quitina e posterior deposição são dois processos bioquímicos altamente complexos que têm início no meio intracelular. Terminando com a inclusão da quitina em estruturas externas como os exoesqueletos e membranas peritróficas, nos artrópodes e paredes celulares, no caso dos fungos (Cohen, 2001).

A síntese de quitina é catalisada pela enzima sintetase da quitina (UDP-N-acetil-D-glucosamina: quitina 4 β -N-acetil-glucosaminiltransferase; EC 2.4.1.16), enzima conservada encontrada em todos os organismos produtores de quitina e que desempenha um papel crucial no crescimento e desenvolvimento fúngico (Cohen, 2001; Merzendorfer and Zimoch, 2003; Merzendorfer, 2006).

O mecanismo catalítico, assim como a regulação da enzima, ainda são pouco conhecidos (Merzendorfer and Zimoch., 2003).

Os genes da sintetase da quitina (CHS) foram inicialmente isolados e sequenciados em leveduras e fungos filamentosos (Cohen, 2001).

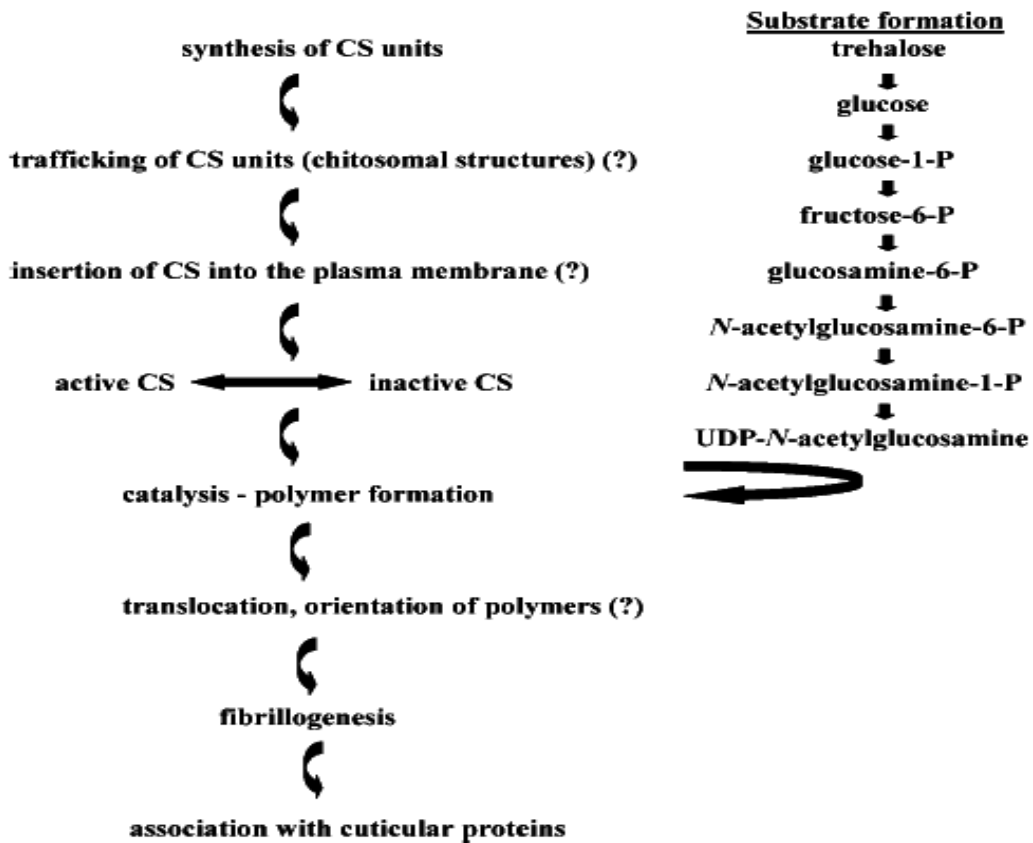


Figura 3. Eventos associados à formação e deposição da quitina. (?) = Mecanismo desconhecido (adaptado de Cohen, 2001).

A síntese da quitina é altamente compartimentalizada. A enzima sintetase da quitina ocorre na forma de zimógeno (estudos enzimáticos em leveduras e fungos filamentosos demonstram que a maioria das CHS's têm uma actividade latente, sendo necessária uma prévia activação proteolítica (Bowen *et al.*, 1992), e encontra-se distribuída em regiões específicas da superfície celular, os quitossomas (vesículas especializadas) (Cohen, 2001). A montagem macromolecular inicia-se fora do citoplasma, onde a enzima protease actua na superfície celular activando o zimógeno. Desta forma, a UDP-N-acetilglucosamina é produzida a partir da glicose, e a sintetase da quitina catalisa a transferência de N-acetilglucosamina para a polimerização da cadeia formando a quitina (Fig. 3) (Cohen, 2001; Merzendorfer, 2006).

1.4 Sintetase da quitina

Cada sintetase da quitina (CHS) está integrada na membrana plasmática através de múltiplas hélices trans-membranares (Fig. 4).

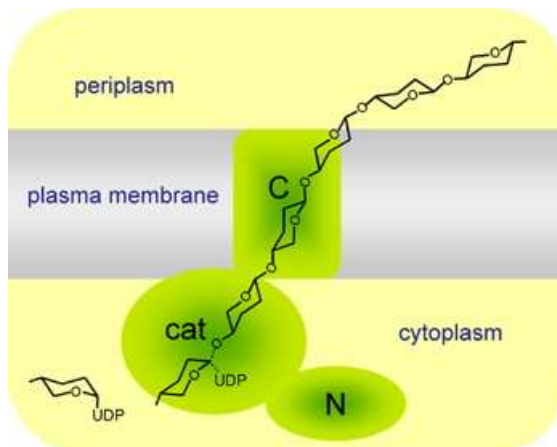


Figura 4. Organização das subunidades de sintetase da quitina classe II (adaptado de www.mpibp-frankfurt.mpg.de/terwisscha/).

A enzima consiste numa cadeia polipeptídica que possui um domínio N-terminal, cuja função é desconhecida, um domínio catalítico central e um domínio C-terminal (Banks *et al.*, 2005).

Através de um processo desconhecido, as cadeias individuais de quitina são expulsas através da membrana plasmática de forma a tornarem-se um componente extracelular da parede celular ou septo (Banks *et al.*, 2005).

Estudos genéticos têm identificado vários genes de CHS. Com base na sequência de aminoácidos deduzidas, as sintetases da quitina foram classificadas em sete classes (I a VII) (Mio *et al.*, 1996; Martín-Urdíroz *et al.*, 2008; Riquelme and Bartnicki-García, 2008), e essas sequências de aminoácidos têm sido utilizadas para construir filogenias (Alves, 2001). As filogenias de fungos baseadas em sintetases da quitina de classe I e II estão geralmente, de acordo com as filogenias baseadas em caracteres morfológicos e comparações de rRNA'S (Alves, 2001).

Cada espécie de fungos contém um número diferente de CHS's pertencentes a diferentes divisões e classes (Martín-Urdíroz *et al.*, 2008).

Os genes de CHS codificam proteínas membranares com quatro a sete domínios. Todas as CHS's fúngicas contêm um subdomínio catalítico conservado (pfam03142) e um pentapéptido (Q (R/G) RRW) (Riquelme and Bartnicki-García, 2008).

A CHS fúngica possui duas regiões conservadas QXXEY e L(A/G)EDRXL (Riquelme and Bartnicki-García, 2008).

As várias classes de CHS's têm sido agrupadas em divisões. As sintetases da quitina classe I, II e III pertencem à divisão 1, caracterizada por conter uma região C-terminal hidrofóbica e um sub-domínio catalítico pfam01644 rodeado pela região N-terminal hidrofílica (Riquelme and Bartnicki-García, 2008).

As sintetases da quitina classes IV, V e VII pertencem à divisão 2, cujo domínio catalítico é precedido por um domínio citocromo b5 (pfam 00173). As classes V e VII ainda apresentam um domínio motor de miosina próximo do N-terminal (Riquelme and Bartnicki-García, 2008).

Recentemente, foi identificada a sintetase da quitina classe VI, sintetase essa que anteriormente tinha sido associada à classe VII. Devido às suas características não pôde ser inserida nas divisões 1 ou 2, logo, e de acordo com alguns autores, foi incluída numa nova divisão 3 (Riquelme and Bartnicki-García, 2008).

Relativamente à divisão 1, as CHS's apresentam um domínio N-terminal que, se encontra no espaço extracelular e um pequeno domínio C-terminal no citoplasma. Na divisão 2 as CHS's apresentam uma região N-terminal extensa e um pequeno domínio C-terminal (espaço extracelular). Quanto à divisão 3, as sintetases da quitina caracterizam-se por possuírem um domínio N-terminal muito pequeno e o C-terminal muito longo (espaço extracelular) (Riquelme and Bartnicki-García, 2008).

O processo de síntese da quitina em leveduras é o mais bem estudado até hoje (Shaw *et al.*, 1991).

O papel específico da cada CHS em diversos fungos tem sido estudado com recurso a análises genéticas e bioquímicas. *Saccharomyces cerevisiae* apresenta três genes que codificam três sintetases da quitina, I, II e III (Hintz, 1999; Banks *et al.*, 2005).

A CHS classe I foi a primeira enzima a ser descoberta e caracterizada. Segundo alguns estudos, esta enzima não é necessária para a formação do septo, todavia, evidências recentes indicam que a CHS classe I apresenta uma função reparadora da parede celular durante o processo de divisão celular (Shaw *et al.*, 1991; Banks *et al.*, 2005). Quanto à enzima da classe II foi identificada e sequenciada posteriormente, sendo essencial na formação do septo primário (Shaw *et al.*, 1991). Relativamente à sintetase da quitina classe III, esta é responsável pela síntese de aproximadamente 80-90% da quitina total celular.

Estudos demonstram que ao danificar-se o gene que codifica CHS classe III ocorre uma diminuição drástica dos níveis de quitina, assim como da taxa de crescimento, acompanhada do aparecimento de defeitos na integridade da célula (Bowman and Free, 2006). Mais recentemente, Kollar *et al.* demonstraram que esta enzima também é essencial na formação da ligação entre a quitina e β -1,3-glucano (Mio *et al.*, 1996).

A deleção simultânea nos três genes resulta num fenótipo letal, o que demonstra que a quitina é um componente indispensável da parede celular da *S. cerevisiae* (Bowman and Free, 2006).

1.5 Inibição do metabolismo da quitina

Devido à integridade estrutural oferecida pela quitina às células fúngicas, a síntese da quitina tem sido considerada um excelente processo para o desenvolvimento de drogas antifúngicas (Hintz, 1999; Merzendorfer, 2006).

Os agentes antifúngicos são classificados de acordo com o tipo de acção que exercem sobre as células dos fungos. Nas classes mais comumente utilizadas encontram-se os polioxinas, as nicomicinas e os seus derivados sintéticos. As nicomicinas e polioxinas são análogos ao substrato de sintetase da quitina, UDP-N-acetilglucosamina, logo são inibidores por competição, contudo as polioxinas e nicomicinas são usadas em conjunto com outros agentes antifúngicos em esquemas de tratamento (Andriole, 1999; Cohen, 2001; Merzendorfer, 2006).

1.6 Objectivos do estudo

Este trabalho apresenta como objectivo principal a clonagem e caracterização de genes de sintetase da quitina presentes em *Botryosphaeria dothidea* e *B. corticis*, assim como a análise dos genes obtidos e posterior comparação com genes já estudados e depositados na base de dados Genbank. Pretendeu-se também avaliar a potencial utilização das sequências de CHS's de *Botryosphaeria* spp. como marcadores filogenéticos.

2. Material e Métodos

2.1 Estirpes

Neste estudo foram utilizadas duas estirpes pertencentes a duas espécies do género *Botryosphaeria*, CBS115476 (*Botryosphaeria dothidea*) e CBS119047 (*Botryosphaeria corticis*).

Uma estirpe adicional foi utilizada como hospedeiro em técnicas de DNA recombinante: *E. coli* (F' {*lacI* q *Tn10* (Tet R)} *mcrA* (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) F 80*lacZ* M15 *lac* 74 *recA1* *araD139* (*ara-leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str R) *endA1* *nupG*), TOP 10F' One Shot® Competent Cells da Invitrogen.

Como vector de clonagem foi utilizado o plasmídeo pCR® 2.1, vector de *E. coli*, Ap^R, Kn^R, pUC ori, F1 ori, promotor *lac*, fragmento *lacZα*, T7 (promotor e “priming sites”), “priming sites” M13 “Forward” (-20 e -40) e M13 “Reverse”, igualmente da Invitrogen.

2.2 Conservação dos microorganismos

As estirpes de *E. coli* foram semeadas em placas de LA, contendo ampicilina, X-Gal e IPTG, incubadas a 37°C durante 24 horas e posteriormente conservadas a 4°C.

O meio LA é composto por 10 g de triptona, 5 g de extracto de levedura, 10 g de NaCl e suplementado com 1,5 % de bacto-agar, isto para volumes de 1 litro.

2.2.1 Aditivos para meios de cultura

- **Antibióticos**

- Ampicilina (EuroBio): solução “stock” preparada a 100 mg/ml, em água; esterilizada por filtração e armazenada a -20°C. Usada a 100 µg/ml para selecção de transformantes de *E. coli*.

- **Indicadores de complementação pelo gene *lacZ***

- X-Gal (Fermentas): solução “stock” preparada a 40 mg/ml em dimetilformamida, usada a 80 µg/ml. Armazenada a -20°C, protegendo da luz.
- IPTG (Fermentas): solução “stock” preparada a 100 mM em água; esterilizada por filtração e usada a 0,2 mM. Armazenada a -20°C.

2.3 Extracção de DNA

O protocolo de extracção de DNA das culturas fúngicas foi efectuada de acordo com o método de Möller *et al.* (1992), descrito em seguida:

1. Transferir uma porção de micélio para um microtubo de 2 ml e adicionar 500 µl de TES.
2. Misturar, ferver durante 3 min. e colocar em gelo durante 10 min.
3. Adicionar 10 µl de Proteinase K (20 mg/ml).
4. Incubar a 65°C durante 30 min. (misturar ocasionalmente).
5. Adicionar 140 µl de NaCl 5M e 65 µl de CTAB 10%.
6. Incubar a 65°C durante 30 min. (misturar ocasionalmente).
7. Adicionar 1 ml de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e misturar suavemente por inversão durante 1 min.
8. Incubar durante 30 min. em gelo.
9. Centrifugar durante 10 min. a 12000 rpm e 4°C.
10. Transferir o sobrenadante para um microtubo de 1,5 ml.
11. Adicionar 225 µl de NH₄OAc 5M e misturar suavemente.
12. Incubar durante 30 min. em gelo.
13. Centrifugar durante 10 min. a 12000 rpm e 4°C.
14. Transferir o sobrenadante para um microtubo de 1,5 ml.
15. Adicional 0,55 volumes de isopropanol frio (-20°C) e misturar suavemente.
16. Incubar durante 30 min. em gelo.
17. Centrifugar durante 10 min. a 12000 rpm e 4°C.
18. Descartar o sobrenadante.
19. Lavar o pellet com etanol 70%.
20. Descartar o sobrenadante.
21. Centrifugar durante 10 min. a 12000 rpm e 4°C.
22. Secar o pellet na bancada.
23. Dissolver em TE (30-100 µl) e armazenar a -20°C.

2.4 Amplificação por PCR

A amplificação por PCR de um fragmento do gene que codifica para a sintetase da quitina foi realizada utilizando o seguinte conjunto de “primers”, descritos por Bowen *et al.* (1992):

CS1 5’-(AC (AGCT) ATGTA (CT) AA (CT) GA (AG) GA (CT))-3’

CS2 5’-(CA (AG) AA (CT) TT (CT) GA (AG) TA (CT) AA (AG))-3’

1. Preparação da reacção de amplificação do gene da sintetase da quitina (adaptado de Bowen *et al.*, 1992);

Reacção (50µl)	Volume (µl)	Concentração final
H₂O	Variável	-----
Tampão PCR 10x sem MgCl₂	2,5	0,5x
Tampão PCR 10x com (NH₄)₂SO₄	2,5	0,5x
MgCl₂ 25mM	6	3 mM
dNTP's 2mM	5	200 µM
Primer CS1 100pmol/µl	0,5	0,3 µM
Primer CS2 100pmol/µl	0,5	0,3 µM
DNA molde	1	50-100 ng
Taq Polimerase 1U/µl	1	1U

2. Procedeu-se à amplificação por PCR, de acordo com o seguinte programa de amplificação: desnaturação inicial de 5 min. a 95°C, seguida de 30 ciclos (desnaturação a 94 °C, 1 min.; “annealing” a 50°C, 1 min.; extensão a 72°C , 3 min.) e uma extensão final de 10 min. a 72°C. No final mantiveram-se os tubos a 15°C.
3. Observou-se uma alíquota de cada reacção de PCR num gel de agarose a 1,5% em TAE 1x.

2.5 Clonagem

Os produtos de amplificação obtidos por PCR foram clonados, utilizando o kit Original TA Cloning® Kit (Invitrogen). Os fragmentos obtidos por PCR foram inseridos no plasmídeo pCR® 2.1 (Invitrogen), que por sua vez foi introduzido em células de *E. coli* TOP 10® F One Shot® Competent Cells (Invitrogen). A figura 5 apresenta o mapa do vector pCR® 2.1, que contém uma região com múltiplos locais de restrição, genes de resistência a antibióticos (selecção de transformantes que adquiriram o plasmídeo) e um gene *lacZ*, cuja sequência é interrompida pela presença de um inserto, passando o gene a ser não-funcional, dado que o gene que produz a enzima beta-galactosidase é inativado.

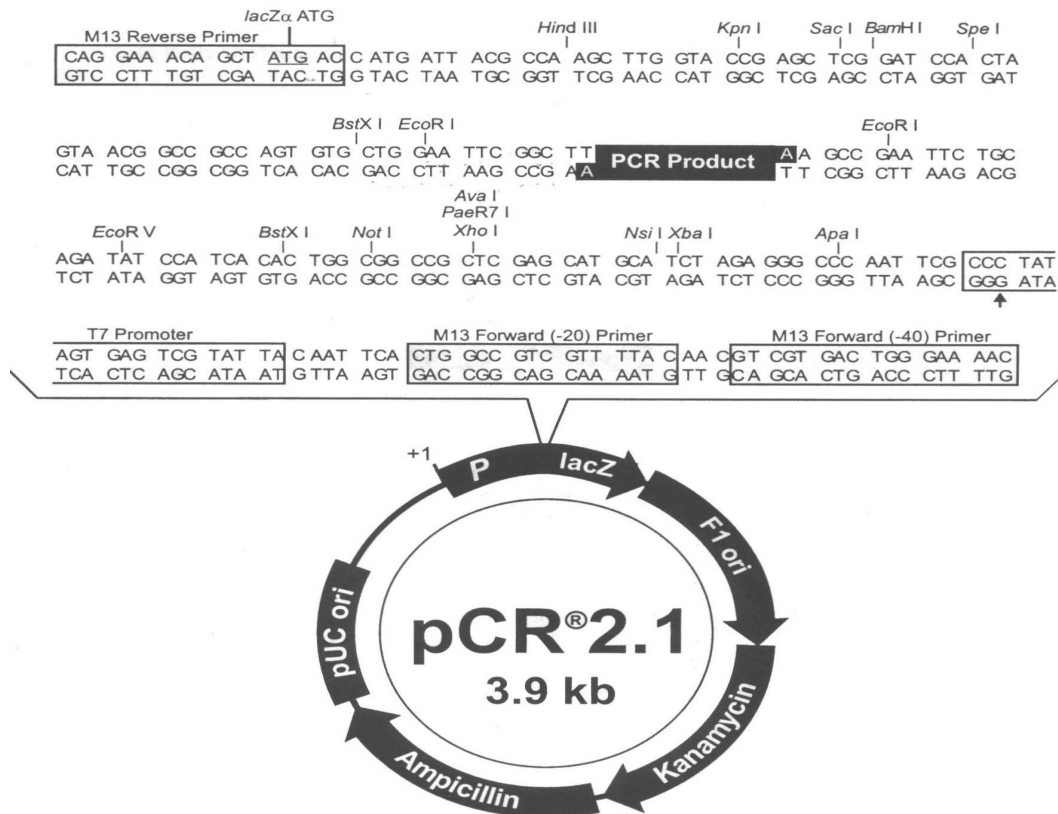


Figura 5. Mapa do vector de *E. coli* pCR® 2.1, para clonagem de fragmentos de DNA obtidos por PCR.

Com a utilização deste kit elimina-se a necessidade de modificações enzimáticas do produto de PCR, o uso de “primers” contendo locais de restrição, assim como a necessidade de purificação dos produtos PCR.

A *Taq* polimerase, possui uma actividade independente do DNA molde, que adiciona um único resíduo de deoxiadenosina (A) aos extremos 3' dos produtos de PCR.

O vector linearizado fornecido com este kit, possui um único resíduo de deoxitimidina (T) nos seus extremos 3', permitindo que os fragmentos de PCR liguem eficientemente ao vector.

2.5.1 Ligação de fragmentos de DNA

A ligase do fago T4 usou-se para unir covalentemente os fragmentos de DNA obtidos por PCR. Esta enzima catalisa as ligações fosfodiester entre os extremos 3'-OH e 5'-P do DNA, requerendo Mg^{2+} e ATP como cofactores. Para uma eficiência de ligação óptima é conveniente utilizar produtos de PCR com menos de 1 dia. De igual modo, não é aconselhável o armazenamento dos produtos de PCR a $-20^{\circ}C$. O procedimento de ligação foi realizado de acordo com as indicações do fornecedor.

1. Preparação da reacção de ligação de fragmentos de DNA;

Reacção (50µl)	Volume (µl)
H ₂ O estéril	5
Produto PCR	1
Tampão de ligação 10x	1
pCR [®] 2.1 vector (25ng/ µl)	2
T4 DNA Ligase (4.0 unidades Weiss)	1

2. Incubou-se a reacção a $14^{\circ}C$ overnight;
3. Armazenou-se a reacção de ligação a $-20^{\circ}C$.

2.5.2 Transformação de células competentes de *E. coli*

A transformação é o tipo mais simples de transferência de genes: uma célula receptora adquire genes de moléculas de DNA solúveis no meio, sendo este o procedimento usado em laboratório para transferir o produto de uma reacção de ligação para *E. coli*. O processo de transformação, embora ocorrendo nos ambientes naturais, é optimizado no laboratório com a preparação prévia das células: a cultura de *E. coli* a

utilizar é tratada de forma a ser tornada “competente”, tornando-se mais eficiente na aquisição de DNA exógeno.

Essa transformação foi realizada de acordo com o método descrito em seguida:

1. Centrifugar brevemente os tubos contendo as reacções de ligação e colocá-los em gelo.
2. Descongelar uma alíquota de 50 µl de células competentes One Shot[®], mantendo o tubo em gelo.
3. Pipetar 2 µl da reacção para o tubo contendo as células competentes e misturar suavemente com a ponta da micropipeta.
4. Manter em gelo 30 min., e armazenar a restante reacção de ligação a -20°C.
5. Aplicar um choque térmico durante exactamente 30 seg., num banho a 42°C. Não mexer nem agitar. Retirar os tubos do banho e colocar em gelo.
6. Adicionar 250 µl de meio SOC (à temperatura ambiente).
7. Incubar num agitador a 37°C durante 1 h, e a 225 rpm. Manter os tubos na horizontal.
8. Semear alíquotas de 10-50 µl em placas de LA+Ap contendo IPTG e X-Gal. É conveniente semear diferentes volumes para garantir a obtenção de colónias isoladas.
9. Incubar as placas a 37°C, durante pelo menos 18 h. Após a incubação colocá-las a 4°C durante 2-3 h, para um desenvolvimento apropriado da cor.

Os transformantes cuja marca de selecção é a resistência ao antibiótico ampicilina foram seleccionados em placas contendo meio LA com Ap, X-Gal e IPTG, pois as células não transformadas não tiveram oportunidade de formar colónias. Os transformantes cuja marca de selecção é o gene *lacZ* também foram seleccionados; os que revelaram interesse foram escolhidos aleatoriamente pela cor branca.

Posteriormente foram repicados e mantidos em placas idênticas às de selecção.

2.6 Amplificação dos clones por PCR

Amplificação por PCR de clones (amostra CBS115476 e amostra CBS119047), utilizando um conjunto de “primers”, **M13** (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') e **T7** (5'-CCC TAT AGT GAG TCG TAT TA-3').

Para a obtenção de DNA desses clones adicionou-se uma porção de células a 10µl de água destilada e submeteram-se a um banho a 100 °C durante 3 min.

1. Preparação da reacção de amplificação dos clones.

Reacção (50µl)	Volume (µl)	Concentração final
H ₂ O	Variável	-----
Tampão PCR 10x sem MgCl ₂	2,5	0,5x
Tampão PCR 10x com (NH ₄) ₂ SO ₄	2,5	0,5x
MgCl ₂ 25mM	6	3 mM
dNTP's 2mM	5	200 µM
Primer M13 10pmol/µl	1,5	0,3 µM
Primer T7 10pmol/µl	1,5	0.3 µM
DNA molde	5	50-100 ng
Taq Polimerase 1U/µl	1	1U

- Procedeu-se à amplificação por PCR, de acordo com o seguinte programa de amplificação: desnaturação inicial de 5 min. A 95°C, seguida de 30 ciclos (desnaturação a 94 °C, 1 min.; “annealing” a 50°C, 1 min.; extensão a 72°C , 3 min.) e uma extensão final de 10 min. A 72°C.
- Observou-se, num transiluminador, uma alíquota de cada reacção de PCR num gel de agarose a 1 % em TAE 1x (corado com brometo de etídeo (EtBr) a 5 µg/ml, em tampão de electroforese).
- Por comparação com a migração de padrões de peso molecular conhecido, procedeu-se à selecção dos clones cujo perfil electroforético revelam a presença de um fragmento de gene de sintetase da quitina (aproximadamente 800 pb).

2.7 Digestão de DNA com endonucleases de restrição

As digestões foram realizadas, com auxílio da enzima *Hae*III (Pharmacia Biotech), em volumes de 10 µl, de acordo com o esquema seguinte:

1. Preparação da reacção de digestão com endonuclease de restrição *Hae*III.

Reacção (10µl)	Volume (µl)
H ₂ O estéril	3,9
Tampão enzima 10x	1
DNA a digerir	5
Enzima <i>Hae</i> III	0,1

2. Incubou-se a reacção a 37°C overnight.
3. Observou-se uma alíquota de cada reacção num gel de agarose a 2% em TAE 1x.

2.8 Determinação da sequência nucleotídica

A obtenção de DNA molde de boa qualidade para sequenciação passou por um processo de purificação que eliminou sais ou outras moléculas que poderiam inibir a actividade da DNA polimerase e pequenos fragmentos de ácidos nucleicos que poderiam funcionar como “primers” indesejáveis.

Os produtos amplificados por PCR destinados a sequenciação foram purificados com o kit JETQUICK PCR Purification Spin Kit (Genomed) seguindo o protocolo do fabricante, obtendo-se no final o DNA purificado.

A determinação da sequência nucleotídica dos fragmentos clonados foi realizada pelo laboratório STABVida Lda.

2.9 Análise computacional

As sequências de nucleótidos foram analisadas com os programas BLAST (pesquisa de similaridade de sequências), ClustalW2 (alinhamento de sequências), *ExPASy* (tradução de nucleótidos para aminoácidos), NetAspGene (procura de intrões) acessíveis em

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>, <http://www.ebi.ac.uk/services/>, <http://www.expasy.ch/> e <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetAspGene/>, respectivamente.

Relativamente à análise filogenética usou-se o programa Clustal X (alinhamento de sequências) e PAUP v. 4.0b10 (Swofford, 2003) (análises filogenéticas) e o programa TREEVIEW (visualização e arranjo gráfico das árvores filogenéticas).

2.10 Marcação e Hibridação

2.10.1 Marcação por PCR

Para a marcação das sondas usaram-se como molde 3 clones já sequenciados, cada um pertencente a uma classe de sintetase da quitina (I, II e III). A marcação de sondas de DNA foi feita usando o sistema DIG de marcação e detecção não-radioactiva de ácidos nucleicos (Roche), como indica a figura 6.

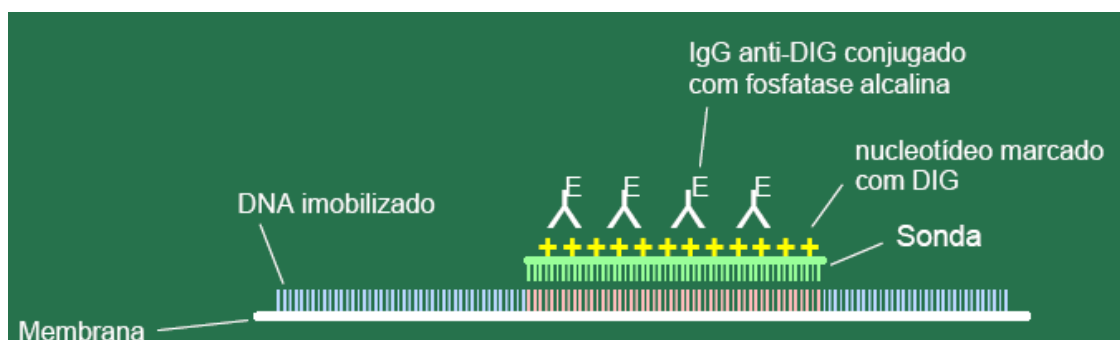


Figura 6. Esquema de hibridação com sondas não radioactivas (adaptado de http://www.ufv.br/dfp/virologia/FIP704_teor_files/Semanas_7_e_8_Diagnose_molecular_de_fitopatogenos.pdf).

Durante as reacções de PCR a enzima *Taq* DNA polimerase tem a capacidade de incorporar DIG-dUTP nas novas cadeias que são sintetizadas. As sondas resultantes são extremamente sensíveis e o rendimento da reacção de marcação é bastante elevado. Após a reacção de amplificação, apenas uma banda deve ser visível em gel de agarose após coloração com EtBr, pois mesmo quantidades mínimas de produtos secundários podem afectar a especificidade da hibridação. Este método de marcação não-radioactiva apresenta várias vantagens: a tecnologia é segura; as sondas podem ser guardadas pelo menos um

ano (sondas de DNA devem ser guardadas a -20°C e sondas de RNA a -70°C), sem perda de actividade; e as soluções de hibridação podem ser reutilizadas várias vezes.

Os produtos das reacções de amplificação foram visualizados em gel de agarose a 1,5%, previamente corado com EtBr.

As reacções foram realizadas em volumes de 50 µl, de acordo com o esquema seguinte:

Reacção (50µl)	Volume (µl)	Concentração Final
H ₂ O	Variável	-----
10x PCR buffer sem MgCl ₂	5	0,5x
10x PCR buffer com (NH ₄) ₂ SO ₄	5	0,5x
MgCl ₂ 25mM	6	3 mM
PCR DIG Labeling Mix	5	200 µM
Primer CS1 10pmol/µl	1	0,3 µM
Primer CS2 10pmol/µl	1	0,3 µM
DNA molde	1	50-100 ng
Taq polimerase 1U/ µl	0,2	1U

As reacções de marcação por PCR são equivalentes às reacções de amplificação normais, com a substituição dos dNTP's pela mistura PCR DIG Labeling Mix da Roche (2mM dATP, 2 mM dGTP, 2mM dCTP, 1,9 mM dTTP e 0,1mM DIG-11-dUTP).

2.10.2 Digestão de DNA genómico com endonucleases de restrição

Os fragmentos de DNA digeridos pertencem a 4 estirpes de *Botryosphaeria*: *Botryosphaeria dothidea* (CBS113191 e CBS115476) e *Botryosphaeria corticis* (CBS119047, CBS119048). As digestões foram realizadas, com auxílio da enzima *HindIII* (Pharmacia Biotech), em volumes de 30 µl, de acordo com o esquema seguinte:

1. Preparação da reacção de digestão com endonuclease de restrição *HindIII*.

Reacção (10µl)	Volume (µl)
H ₂ O estéril	10
Tampão enzima 10x	3
DNA a digerir	10
Enzima <i>HindIII</i>	2

2. Incubou-se a reacção a 37°C overnight.
3. Observou-se uma alíquota de cada reacção num gel de agarose a 0,8 % em TAE 1x.

2.10.3 Transferência para membrana de nylon

Os fragmentos de DNA digeridos das 4 estirpes de *Botryosphaeria* foram transferidos para uma membrana de nylon empregando o método de Vacuum-Blotting (VacuGeneTMXL, Pharmacia Biotech), como se descreve de seguida:

1. Colocar o gel em solução despurinizante durante 10 min. com agitação suave.

Solução despurinizante: HCl 0,25 N

2. Remover a solução anterior e adicionar solução desnaturizante, manter com agitação suave durante 45min.

Solução desnaturizante: NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M

3. Remover a solução anterior e adicionar solução neutralizante, manter com agitação suave durante 30 min.

Solução neutralizante: NaCl 1,5 M; Tris-HCl 1 M; EDTA 1 mM (pH 7,2-7,5)

4. Cortar uma membrana de nylon (GE Healthcare) com dimensões ligeiramente superiores às do gel.
5. Humedecer a membrana em água.
6. Colocar a membrana na unidade de transferência e efectuar a montagem de acordo com as instruções do fabricante do sistema.
7. Começando num extremo, colocar suavemente o gel sobre a membrana, evitando a formação de bolhas de ar entre o gel e a membrana.
8. Verter sobre o gel a solução de transferência (SSC 20x) e ligar o aparelho; deixar que estabilize a 50 mbar; manter 60 min.

SSC 20x: NaCl 3 M; Citrato de sódio 0,3 M (pH 7,0)

9. Retirar todo o líquido, remover o gel e retirar a membrana. Lavar a membrana em SSC 2x.

10. Secar e fixar o DNA por UV durante 5 min.

2.10.4 Hibridação

As membranas foram introduzidas em tubos de vidro fechados com tampa. A temperatura de hibridação foi decidida de acordo com a percentagem de bases idênticas esperada entre o DNA sonda e o DNA alvo. Para o caso de sondas em que 100 % das bases seriam idênticas, a temperatura de hibridação é de 65°C na ausência de formamida e de 45°C na presença de formamida (Casey & Davidson, 1977).

A pré-hibridação prepara a membrana para a ligação da sonda, bloqueando os locais inespecíficos de ligação de ácidos nucleicos, permitindo assim a redução do “background” na mesma. As lavagens com as soluções I e II removem toda a sonda não ligada, permitindo de igual modo reduzir o “background” na membrana.

A hibridação decorreu do modo descrito em seguida:

1. Introduzir a membrana num frasco de vidro fechado com tampa, e adicionar solução de pré-hibridação (20 ml por cada 100 cm² de membrana).

Solução de pré-hibridação: SSC 5x; solução bloqueadora 1 %; Sarcosil 0,1 %; SDS 0,02 %

2. Pré-hibridar à temperatura de hibridação durante 2 h. Períodos de tempo superiores são aceitáveis.

3. Desnaturar a sonda (no caso de dsDNA, para ssDNA e RNA não é necessário), num banho de água a ferver durante 10 min. e arrefecer rapidamente em gelo.

4. Diluir a sonda em solução de hibridação. Preparar pelo menos 3,5 ml de solução de hibridação para uma membrana de 10 x 10 cm.

Solução de hibridação: SSC 5x; solução bloqueadora 1 %; Sarcosil 0,1 %; SDS 0,02 %

5. Descartar a solução de pré-hibridação e adicionar a solução de hibridação contendo a sonda marcada. Hibridar overnight (aprox. 16 h) à temperatura de hibridação.

6. Após a hibridação, verter a solução para um tubo e armazenar (sonda de DNA a -20°C e de RNA a -70°C). Para reutilizar, descongelar a solução e desnaturar a 95°C durante 10 min. No caso de a solução conter 50% de formamida, desnaturar a 68°C durante 10 min.

7. Lavar a membrana em solução I, duas vezes, durante 5 min. à temperatura ambiente.

Solução I: SSC 2x; SDS 0,1%

8. Lavar a membrana em solução II, duas vezes, durante 15 min. à temperatura de hibridação.

Solução II: SSC 0,5x; SDS 0,1%

2.10.5 Detecção colorimétrica com NBT e BCIP

A formação de híbridos entre as sondas e o DNA alvo foi revelada por imunodetecção com anti-digoxigenina conjugada com a fosfatase alcalina (anti-DIG-AP) e, posteriormente visualizadas, com substratos colorimétricos NBT/BCIP (Roche). Todo o procedimento de lavagem das membranas e detecção é realizado à temperatura ambiente. As membranas de nylon podem ser reutilizadas, sendo para isso sujeitas a procedimentos específicos para eliminação da cor e também da sonda.

A detecção decorreu do modo descrito de seguida:

1. Após a hibridação e lavagens pós-hibridação, equilibrar a membrana em tampão de ácido maleico durante 1-5 min.

Tampão de ácido maleico: ácido maleico 0,1 M; NaCl 0,15 M (pH 7,5)

2. Lavar a membrana em solução bloqueadora, diluída 1:10 em tampão de ácido maleico, durante 30 min., agitando suavemente.

3. Diluir Anti-Digoxigenina-AP Conjugate (1:5000) em solução bloqueadora 1:10 em tampão ácido maleico.

4. Incubar a membrana na solução anterior durante 30 min., com agitação suave.

5. Descartar a solução de anticorpos. Lavar a membrana duas vezes, durante 15 min., em tampão de ácido maleico.

6. Preparar solução corante (200 ml de solução “stock” de NBT/BCIP para 10 ml de tampão de detecção).

Tampão de detecção: Tris-HCl 0,1 M; NaCl 0,1 M; MgCl₂ 50 mM

7. Equilibrar a membrana em tampão de detecção durante de 2-5 min.

8. Incubar a membrana em solução corante, no escuro, e sem agitação.
9. Parar a reacção lavando a membrana com H₂O ou TE.

3. Resultados

3.1 Amplificação por PCR

O DNA genómico extraído de *B. dothidea* CBS115476 e *B. corticis* CBS119047 foi submetido a uma amplificação, pela técnica de PCR, com o objectivo de amplificar um fragmento do gene que codifica para a sintetase da quitina, utilizado um conjunto de “primers” descritos por Bowen *et al* (1992).

A análise do gel de agarose dos produtos de amplificação revelou a presença de uma banda distinta de cerca de 600 pb (Fig. 7).

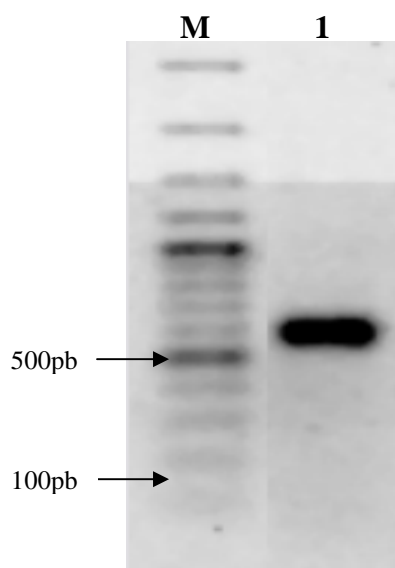


Figura 7. Produto de amplificação por PCR de um fragmento que codifica para a sintetase da quitina, após electroforese em gel de agarose a 1,5%. **M** – Marcador Gene Ruler™ 100pb DNA Ladder, **1** – Fragmento do gene que codifica para sintetase da quitina.

3.2 Clonagem, transformação

Os fragmentos de genes obtidos por amplificação por PCR foram clonados no vector pCR® 2.1. Após a transformação em *E. coli* obtiveram-se clones recombinantes que foram semeados em placas contendo meio LA com ampicilina, X-Gal e IPTG (Fig. 8).

A diferenciação entre as colónias contendo plasmídeo com inserto das que contêm plasmídeo sem inserto foi feita pela cor, branca e azul, respectivamente.

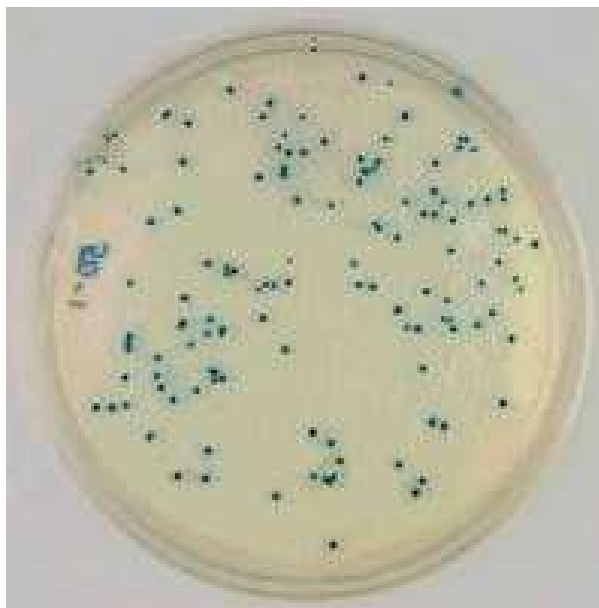


Figura 8. Colónias brancas e azuis resultantes do crescimento em meio selectivo de *E. coli* transformada com um vector com selecção pelo *LacZ* (adaptado de Alves et al., 2003).

As colónias de cor branca foram seleccionadas aleatoriamente e repicadas para placas idênticas às de selecção. Cada colónia foi numerada, de 1 a 32.

3.3 Amplificação dos clones por PCR

Com o objectivo de identificar a presença do inserto no plasmídeo, 40 clones de *E.coli* crescidos em meio selectivo (20 clones de cada amostra) foram submetidos a uma PCR usando “primers” homólogos às sequências do vector (M13 reverse e T7 promoter), próximas ao local de clonagem. A PCR dos clones gerou um fragmento de aproximadamente 800 pb em dezasseis dos vinte clones de CBS115476 e em treze dos vinte clones da amostra CBS119047, em que 600 pb correspondem ao fragmento do gene CHS e os restantes a resíduos do vector.

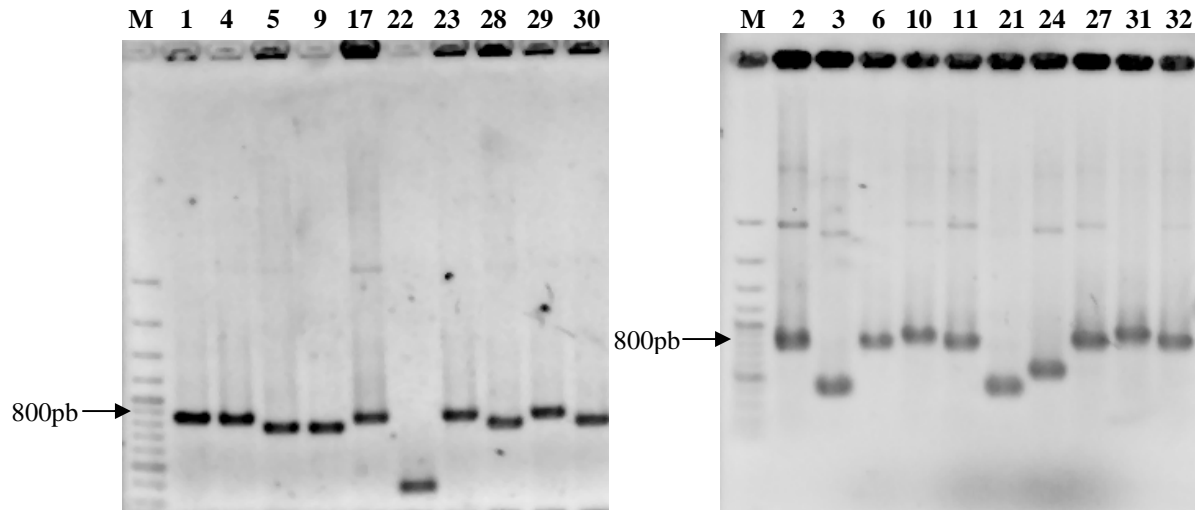


Figura 9. Electroforese em gel de agarose a 1% da amplificação por PCR de 20 clones da amostra CBS115476, usando os “primers” T7 “promoter” e M13 “reverse primer” do vector pCR[®] 2.1.

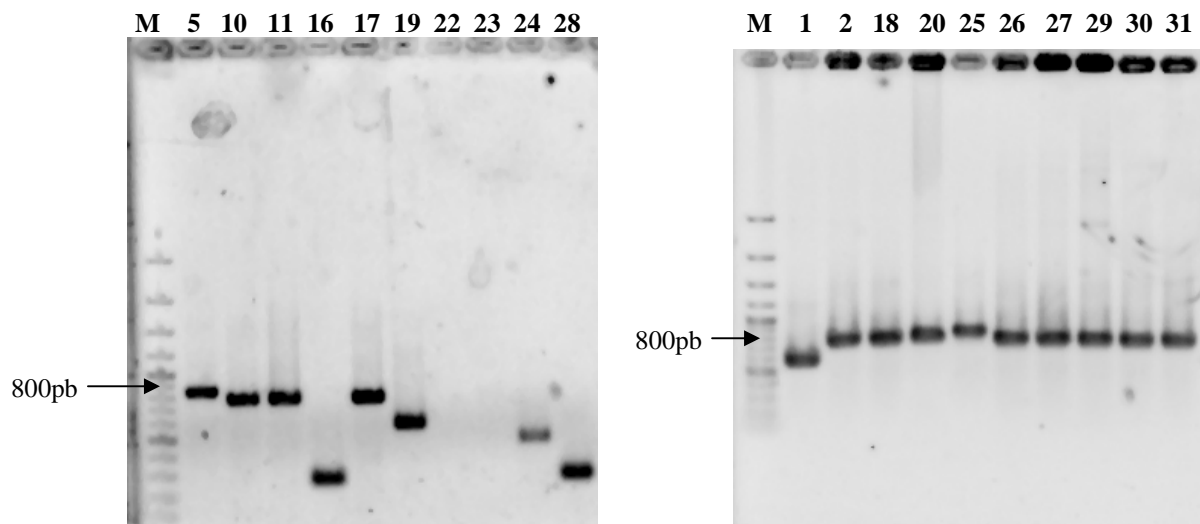


Figura 10. Electroforese em gel de agarose a 1% da amplificação por PCR de 20 clones da amostra CBS119047, usando os “primers” T7 “promoter” e M13 “reverse primer” do vector pCR[®] 2.1.

3.4 Digestão de DNA com endonucleases de restrição

Após a análise dos resultados anteriores, procedeu-se à selecção dos clones cujo perfil electroforético revelou a presença do fragmento de gene que codifica para a sintetase da quitina (aproximadamente 800 pb).

A fim de identificar clones idênticos, o fragmento de cada clone obtido da amplificação anterior foi digerido com a enzima de restrição *Hae*III. Clones com perfis de restrição diferentes foram seleccionados e sequenciados.

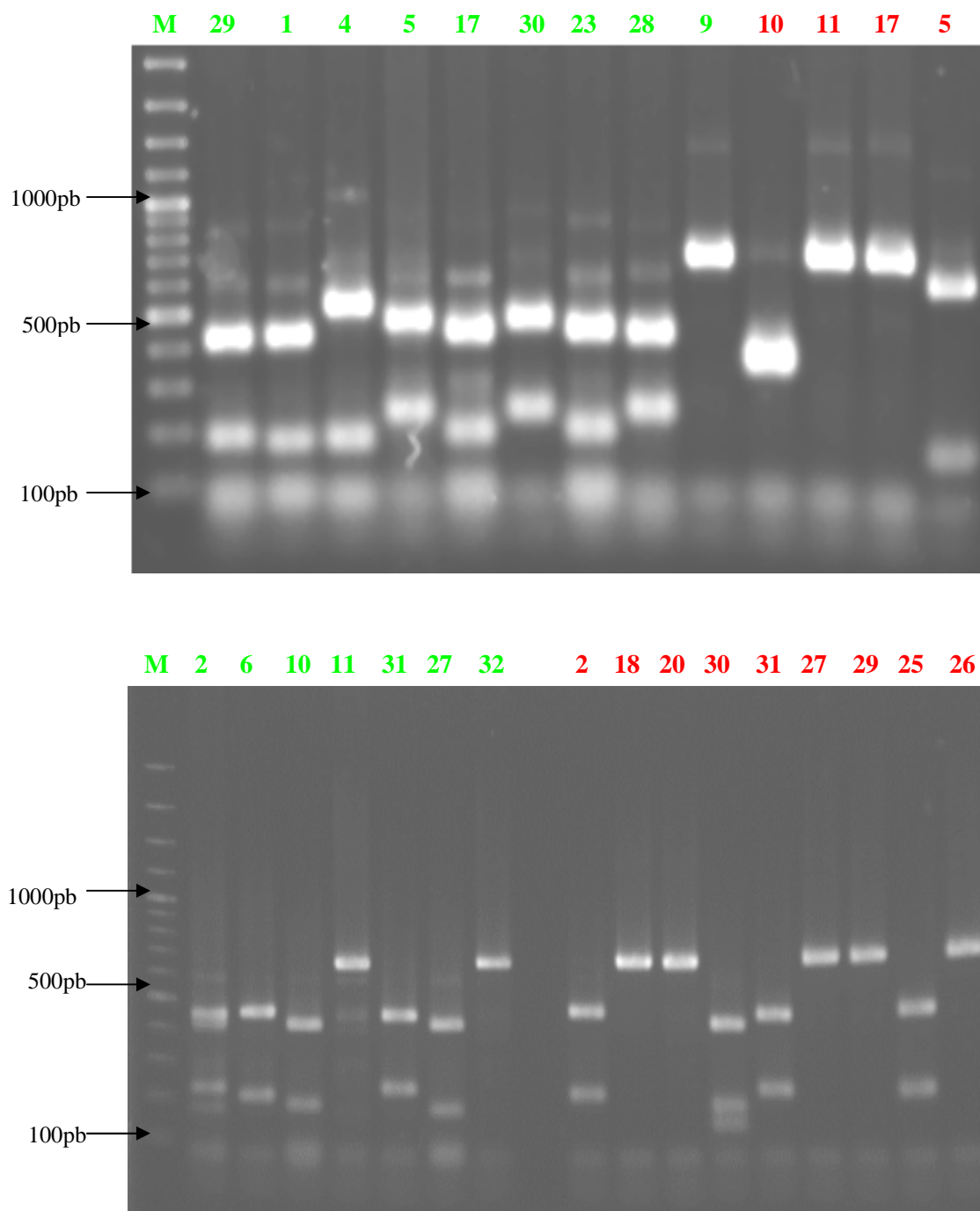


Figura 11. Produto da reacção de digestão de 29 clones com a enzima *Hae*III, seguido de electroforese em gel de agarose a 2%. A verde, os clones pertencentes à amostra CBS115476 e a vermelho, os clones pertencentes à amostra CBS119047.

3.5 Análise das sequências nucleotídicas e de aminoácidos

Após a análise da figura 9 foram seleccionados, para sequenciação, os clones 1, 4, 6, 9, 17, 27, 28, 29, 30, 31 e 32 pertencentes à amostra CBS115476 e 2, 5, 10, 18, 25 e 30 da amostra CBS119047.

Utilizando “software” disponível na Internet, ExPASy e NetAspGene, foi deduzida a sequência de a.a. dos fragmentos sequenciados (Fig. 12) e determinou-se a presença de intrões, respectivamente. De igual modo, foi realizada uma pesquisa, utilizando o programa BLAST, disponível na Internet, tendo-se verificado que os fragmentos sequenciados apresentam uma elevada percentagem de identidade com sequências de genes de sintetase da quitina de diversos fungos, já conhecidas e depositadas em bases de dados.

B. dothidea

Clone 1

aagggttctgacggccagaacgcttcacgggtgttatgcagaacatccgcgatattgtcaac
K V L T A R T L H G V M Q N I R D I V N
ctgaagaagtcgagttctggaacaagggtgggtccggcctggcaaaagattgtcgtgtgc
L K K S E F W N K G G P A W Q K I V V C
ttgggtcttcgacgggtatcgaccctgacgacaagggcacgctcgacgtcctcgccaccatt
L V F D G I D P C D K G T L D V L A T I
gggtatctaccaggacgggtgtcatgaagaggatcgacggcaaggagacgactgacgac
G I Y Q D G V M K R D I D G K E T T A H
attttcgaatacacgaccagctgtctgttaccctcccaaccagcagctgatccgcccgcac
I F E Y T T Q L S V T P N Q Q L I R P H
gatgacagctccagcaccctgccccgggtgcagatgatgtactgtctgaagcagaagaac
D D S S S T L P P V Q M M Y C L K Q K N
accaagaagatcaactctcaccgttgggtctttactgctttcggcagaatcctcaaccct
T K K I N S H R W L F T A F G R I L N P
gaagttgttattctgattgatgcccgtaccaagcccggcccccaagtcctctgctcgcgctt
E V V I L I D A G T K P G P K S L L A L
tgggaggtctttctacaacgacaaggatctcggtgggtgcctgtgggtgaaattcacgccatg
W E A F Y N D K D L G G A C G E I H A M
ttgggcaagggtggaagaacctcgtcaacccccctcatcgccgct
L G K G W K N L V N P L I A A

Clone 4

aagggttctgacggccagaacgcttcacgggtgttatgcagaacatccgcgatattgtcaac
K V L T A R T L H G V M Q N I R D I V N
ctgaagaagtcgagttctggaacaagggtgggtccagcctggcaaaagattgtcgtgtgc
L K K S E F W N K G G P A W Q K I V V C
ttgggtcttcgacgggtatcgaccctgacgacaagggcacgctcgacgtcctcgccaccatt
L V F D G I D P C D K G T L D V L A T I
gggtatctaccaggacgggtgtcatgaagaggatcgacggcaaggagacgactgacgac
G I Y Q D G V M K R D I D G K E T T A H
atcttcgaatacacgaccagctgtctgttaccctcccaaccagcagctgatccgcccgcac
I F E Y T T Q L S V T P N Q Q L I R P H
gatgacagctccagcaccctgccccgggtgcagatgatgttctgtctgaagcagaagaac
D D S S S T L P P V Q M M F C L K Q K N
accaagaagatcaactctcaccgttgggtctttactgctttcggcagaatcctcaaccct
T K K I N S H R W L F T A F G R I L N P
gaagttgttattccgattgatgcccgtaccaagcccggcccccaagtcctctgctcgcgctt
E V V I P I D A G T K P G P K S L L A L
tgggaggtctttctacaacgacaaggatctcggtgggtgcctgtgggtgaaattcacgccatg
W E A F Y N D K D L G G A C G E I H A M
ttgggcaagggtggaagaacctcgtcaacccccctcatcgccgct
L G K G W K N L V N P L I A A

Clone 6

gatgagctttttgacggaactttgacgggtgtgatcaagaacatcgagtacatgaactcg
D E L F A R T L T G V I K N I E Y M N S
cggacgaatagcaaaacatggggtgaaggatgcgtggaagaagatcggtggtttgcgttgtc
R T N S K T W G K D A W K K I V V C V V
agcgacgggtcggtgcgaagatcaacccgaggacaagggccgtttttggccgggtctgggagtt
S D G R A K I N P R T R A V L A G L G V
taccaggacggcattgccaacagcaagtcaacggcaaggaggtgacggcacatatttac
Y Q D G I A K Q Q V N G K E V T A H I Y
gagtacacctcccaaatgagcctggaaatcaagaagggtgtcgtgaacatcatgaagggc
E Y T S Q M S L E I K K G V V N I M K G
accactccattcagatgctgttctgtttgaaggaaaagaaccagaagaagatcaactcg
T T P I Q M L F C L K E K N Q K K I N S
cacagatggttttccaggctttttggcagcgttctcgaccccaacattttgcgtcctcatc
H R W F F Q A F G S V L D P N I C V L I
gatgccgggtacgaaacccggaaaggactcgatttaccaactctggaaggcattcgacctg
D A G T K P G K D S I Y Q L W K A F D L
gagccaatgtgcgcccggccttgggtgagatcaaggctatggtgggtccacggcaagaag
E P M C A G A C G E I K A M L V H G K K
ctgctcaaccccccttggttgcgacc
L L N P L V A T

Clone 9

gagatcgacttcactcgcaccatgcacggcgatgcggaatatttcgcacttctgctcc
E I D F T R T M H G V M R N I S H F C S
cgcgctaaaagcaggacatggggaaaagatggatggcaaaaaattgtggtctgcatcatc
R A K S R T W G K D G W Q K I V V C I I
gctgatggctcggacaaaggttcacctcgcgtgctcgacgcgttggctgcatgggtgc
A D G R T K V H P R V L D A L A M G C
taccaagaggcatcgccaagaacacggtcaacgaaaaggaggtcacccgcgcagctctac
Y Q E G I A K N T V N E K E V T A H V Y
gaatacaccactcaggtctcgccttgactcggatctcagattcaagggcgagagaagggga
E Y T T Q V S L D S D L R F K G A E K G
attgttccttgccagatcatcttctgtctgaaggaaaagaaccagaaggagctgaactcg
I V P C Q I I F C L K E K N Q K E L N S
cacagatgggttttttaatgcctttgggcgcgccttgaaacctaacatttgcattcttctg
H R W F F N A F G R A L N P N I C I L L
gacgttggtaccaagcctggttccaaagccctctactacctttggaaggctttcgacacg
D V G T K P G S K A L Y Y L W K A F D T
gactccagcggttgctggtgcggctggtgaaatcaaggctggcaaggggcaagggatggctc
D S S V A G A G E I K A G K G K G W L
ggtctcctgaacccttggttgccttct
G L L N P L V A S

Clone 17

aagggttctgacggccagaacgcttcacggtggtatgcagaacatccgcgatattgtcaac
K V L T A R T L H G V M Q N I R D I V N
ctgaagaagtcgagttctggaacaagggtggtccggcctggcaaaagattgtcgtgtgc
L K K S E F W N K G G P A W Q K I V V C
ttggtcttcgacgggtatcgaccctgcgacaagggcacgctcgacgtcctcgccaccatt
L V F D G I D P C D K G T L D V L A T I
ggtatctaccaggacggtgtcatgaagagggatatcgacggcaaggagacgactgcgcac
G I Y Q D G V M K R D I D G K E T T A H
attttcgaatacacgaccagctgtctgttaccctccaccagcagctgatccgcccgcac
I F E Y T T Q L S V T P N Q Q L I R P H
gatgacagctccagcacctgccccgggtgcagatgatgttctgtctgaagcagaagaac
D D S S S T L P P V Q M M F C L K Q K N
accaagaagatcaactctcacggttggtctttactgctttcggtagaatcctcaaccct
T K K I N S H R W L F T A F G R I L N P
gaagttgttattctgattgatgccggtaccaagcccgccccaagtcctctgctcgcgctt
E V V I L I D A G T K P G P K S L R A
tgggaggctttctacaacgacaaggatctcggtgggtgcctgtggtgaaattcacgccatg
W E A F Y N D K D L G G A C G E I H A M
ttgggcaagggctggaagaacctcgtcaacccccctcatcgccgct
L G K G W K N L V N P L I A A

Clone 27

gatgagctttttgcgcgaaatttgaccggtgtgatcaagaacatcgagtacatgaactcg
D E L F A R N L T G V I K N I E Y M N S
cggatgaatagcaaaacatgggtaaggatgcgtggaagaagatcggtggttgcgttgctc
R M N S K T W G K D A W K K I V V C V V
agcgacggctcgtgcgaagatcaacccgaggacaagagccgttttggccggtctgggagtt
S D G R A K I N P R T R A V L A G L G V
taccaggacggcatttgccaaacagcaagtcaacggcaaggaggtgacggcacatatttac
Y Q D G I A K Q Q V N G K E V T A H I Y
gagtacacctcccaaatgagcctggaaatcaagaagggtgtcgtgaacatcaagaagggc
E Y T S Q M S L E I K K G V V N I K K G
accactcccattcagatgcggttctgtttgaaggaaaagaaccagaagaagatcaactcg
T T P I Q M P F C L K E K N Q K K I N S
cacagatgggttttccaggcttttggcagcgttctcgaccccaacatttgcgtcctcatc
H R W F F Q A F G S V L D P N I C V L I
gatgccggtacgaaacccggaaaggactcgatttaccactctggaaggcattcgacctg
D A G T K P G K D S I Y Q L W K A F D L
gagccaatgtgcgcccgcgttgggtgagatcaaggctatggttggtccacggcaagaag
E P M C A G A C G E I K A M L V H G K K
ctgctcaaccccccttggttgcgacc
L L N P L V A T

Clone 28 gatgagcttttttgcgcgaacttttgaccggtgtgatcaagaacatcgagtacatgaactcg
D E L F A R T L T G V I K N I E Y M N S
cggacgaatagcaaaacatggggaaggatgcgtggaagaagatcggtgttgcgttgtc
R T N S K T W G K D A W K K I V V C V V
agcgacggtcgtgcgaagatcaacccgaggacaagagccgttttggccggtctcggagtt
S D G R A K I N P R T R A V L A G L G V
taccaggacggcattgccaacagcaagtcaacggcaaggaggtgacggcacatatttac
Y Q D G I A K Q Q V N G K E V T A H I Y
gagtacacctcccaaagtagcctggaaatcaagaagggtgtcgtgaacatcaagaagggc
E Y T S Q M S L E I K K G V V N I K K G
accactcccattcaggtgctgttctgtttgaaggaaaagaaccagaagaagatcaactcg
T T P I Q V L F C L K E K N Q K K I N S
cacagatgggtttttccaggcttttggcagcgttctcgaccccaacatttgcgtcctcatc
H R W F F Q A F G S V L D P N I C V L I
gatgccggtacgaaacccggaaggactcgatttaccaactctggaaggcattcgacctg
D A G T K P G K D S I Y Q L W K A F D L
gagccaatgtgcgcggcgcttgtggtgagatcaaggctatgttggtccacggcaagaag
E P M C A G A C G E I K A M L V H G K K
ctgctcaaccccccttgttgcgcc
L L N P L V A A

Clone 29 aagggttctgacggccagaacgcttcacggtgttatgcagaacatccgcgatattgtcaac
K V L T A R T L H G V M Q N I R D I V N
ctgaagaagtcgagttctggaacaagggtggtccggcctggcaaaagattgtcgtgtgc
L K K S E F W N K G G P A W Q K I V V C
ttgggtcttcgacgggtatcgacccctgcgacaagggcacgctcgacgtcctcgccaccatt
L V F D G I D P C D K G T L D V L A T I
gggtatctaccaggacggtgtcatgaagaggatcgacggcaaggagacgactgcgcac
G I Y Q D G V M K R D I D G K E T T A H
attttcgaatacacgaccagctgtctgttaccctcccaaccagcagctgatccgcccgcac
I F E Y T T Q L S V T P N Q Q L I R P H
gatgacagctccagcacccctgccccgggtgcagatgatgttctgtctgaagcagaagaac
D D S S S T L P P V Q M M F C L K Q K N
accaagaagatcaactctcacggttggtctttactgcttccggcagaatcctcaaccct
T K K I N S H R W L F T A F G R I L N P
gaagttgttattctgattgatgccggtaccaagcccgccccaagtcctctgctcgcgctt
E V V I L I D A G T K P G P K S L A L
tgggaggctttctacaacgacaaggatctcggtgggtgcctgtggtgaaattcacgccatg
W E A F Y N D K D L G G A C G E I H A M
ttgggcaagggtggaagaacctcgtcaacccccctcatcgccgct
L G K G W K N L V N P L I A A

Clone 30 gatgagcttttttgcgcgaacttttgaccggtgtgatcaagaacatcgagtacatgaactcg
D E L F A R T L T G V I K N I E Y M N S
cggacgaatagcaaaacatggggaaggatgcgtggaagaagatcggtgttgcgttgtc
R T N S K T W G K D A W K K I V V C V V
agcgacggtcgtgcgaagatcaacccgaggacaagagccgttttggccggtctcgggagtt
S D G R A K I N P R T R A V L A G L G V
taccagaacggcattgccaacagcaagtcaacggcaaggaggtgacggcacatatttac
Y Q N G I A K Q Q V N G K E V T A H I Y
gagtacacctcccaaagtagcctggaaatcaagaagggtgtcgtgaacatcaagaagggc
E Y T S Q M S L E I K K G V V N I K K G
accactcccattcagatgctgttctgtttgaaggaaaagaaccagaagaagatcaactcg
T T P I Q M L F C L K E K N Q K K I N S
cacagatgggtttttccaggcttttggcagcgttctcgaccccaacatttgcgtcctcatc
H R W F F Q A F G S V L D P N I C V L I
gatgccggtacgaaacccggaaggactcgatttaccaactctggaaggcattcgacctg
D A G T K P G K D S I Y Q L W K A F D L
gagccaatgtgcgcggcgcttgtggtgagatcaaggctatgttggtccacggcaagaag
E P M C A G A C G E I K A M L V H G K K
ctgctcgaccccccttgttgcgacc
L L D P L L R

Clone 31 aaggttctgacggccagaacgcttcacgggtgttatgcagaacatccgcgatattgtcaac
K V L T A R T L H G V M Q N I R D I V N
ctgaagaagtcgagttctggaacaaggggtggccggcctggcaaaagattgtcgtgtgc
L K K S E F W N K G G P A W Q K I V V C
ttggtcttcgacgggtatcgacccctgcgacaagggcacgctcgacgtcctcgccaccatt
L V F D G I D P C D K G T L D V L A T I
ggtatctaccaggacgggtgtcatgaagagggtatcgacggcaaggagacgactgcgcac
G I Y Q D G V M K R D I D G K E T T A H
attttcgaatacacgaccagccgtctgttaccaccaaccagcagctgatccgccgcac
I F E Y T T Q P S V T P N Q Q L I R P H
gatgacagctccagcaccctgccccgggtgcagatgatgttctgtctgaagcagaagaac
D D S S S T L P P V Q M M F C L K Q K N
accaagaagatcaactctcacggttggtctttactgctttcggcagaatcctcaaccct
T K K I N S H R W L F T A F G R I L N P
gaagttgttattctgattgatgccggtaccaagcccgccccaagtccctgctcgcgctt
E V V I L I D A G T K P G P K S L L A L
tgggaggctttctacaacgacaaggatctcggtgggtgcctgtggtgaaattcacgccatg
W E A F Y N D K D L G G A C G E I H A M
ttgggcaagggctggaagaacctcgtaacccctcatcgccgct
L G K G W K N L V N P L I A A

Clone 32 gagatcgacttcactcgacccatgcacggcgatgcggaatatttcgacttctgctcc
E I D F T R T M H G V M R N I S H F C S
cgcgctaaaagcaagacatggggaaaagatggatggcaaaaattgtggtctgcatcatc
R A K S K T W G K D G W Q K I V V C I I
gctgatggtcggacaaaaggttcactcctcgcggtgctcgacgcggtggctgccatgggttgc
A D G R T K V H P R V L D A L A A M G C
taccaagagggcatcgccaagaacacggtcaacgaaaaggaggtcaccgcgcacgtctac
Y Q E G I A K N T V N E K E V T A H V Y
gaatacaccactcaggtctcgcttgactcggatctcagattcaagggcgagagaagggga
E Y T T Q V S L D S D L R F K G A E K G
attgttccttgccagatcatcttctgtctgaaggaaaagaaccagaagaagctgaactcg
I V P C Q I I F C L K E K N Q K K L N S
cacagatgggttttttaatgcctttgggcgcgcttgaaaccctaacatttgcattcttctg
H R W F F N A F G R A L N P N I C I L L
gacgttggtagcaagcctgggtccaaagccctctactacctttggaaggctttcgacacg
D V G T K P G S K A L Y Y L W K A F D T
gactccagcggttgccgggtgcggctgggtgaaatcaaagctggcaagggcaagggatggctc
D S S V A G A A G E I K A G K G K G W L
ggtctcctgaacccttggttgcttct
G L L N P L V A S

B. corticis

Clone 2

gatgagctttttgcgcaactttgaccggtgtgatcaagaacatcgagtacatgaactcg
D E L F A R T L T G V I K N I E Y M N S
cggacgaatagcaaaacatggggttaaggatgcgtggaagaagatcgtggtttgcgttgct
R T N S K T W G K D A W K K I V V C V V
agcgacggtcgtgcaagatcaacccgaggacaagagccgttttggccggtctgggagtt
S D G R A K I N P R T R A V L A G L G V
taccaggacggcattgccaacagcaagtcaacggcaaggaggtgacggcacatatttac
Y Q D G I A K Q Q V N G K E V T A H I Y
gagtacacctcccaaatgagcctggaaatcaagaagggtgtcgtgaacatcaagaagggc
E Y T S Q M S L E I K K G V V N I K K G
accactcccattcagatgttgttctgtttgaaggaaaagaaccagaagaagatcaactcg
T T P I Q M L F C L K E K N Q K K I N S
cacagatggtttttccaggcttttggcagcgttctcgacccaacatttgcgtcctcatc
H R W F F Q A F G S V L D P N I C V L I
gatgccggtacgaaacccggaaaggactcgatttaccactctggaaggcattcgacctg
D A G T K P G K D S I Y Q L W K A F D L
gagccaatgtgcgccggcgttgttggtgagatcaaggctatgttggtccacggcaagaag
E P M C A G A C G E I K A M L V H G K K
ctgctcaaccccccttgttgcgacc
L L N P L V A T

Clone 5

aagggttctgacgtccagaacgcttcacggtgttatgcagaacatccgcgatattgtcaac
K V L T S R T L H G V M Q N I R D I V N
ctgaagaagtcgagttctggaacaagggtgggtccggcctggcaaaagattgtcgtgcgc
L K K S E F W N K G G P A W Q K I V V R
ttggctcctcgacgggtatcgacccctgcgacaagggcacgctcgacgtcctcgccaccatt
L V L D G I D P C D K G T L D V L A T I
ggatatctaccaggaggtgtcatgaagaggatctcgacggcaaggagactactgcgcac
G I Y Q D G V M K R D I D G K E T T A H
attttgaatacacgacccagctgtctgttaccaccaaccagcagctgatccgcccgcac
I F E Y T T Q L S V T P N Q Q L I R P H
gatgacagctccagcactctgcccccggtgcagatgatgttctgtttgaagcagaagaac
D D S S S T L P P V Q M M F C L K Q K N
accaagaagatcaactctcaccggttggtctttactgctttcggcagaatcctcaaccct
T K K I N S H R W L F T A F G R I L N P
gaagttgttattctgattgatgccggtaccaagcccggtcccaagtcctgctcgcgctt
E V V I L I D A G T K P G P K S L L A L
tgggaggttttctacaacgacaaggatctcggtggtgcctgtggtgaaattcacgccatg
W E A F Y N D K D L G G A C G E I H A M
ttgggcaagggtggaagaatctcgtcaacccgctcatcgccgct
L G K G W K N L V N P L I A A

Clone 10

gagatcgacttcactcgacccatgcacggcgtcatgcggaatatttcgcacctctgctcc
E I D F T R T M H G V M R N I S H L C S
cgcgccaaaagcaggacttggggaaaagatggatggcaaaaattgtggtctgcatcatc
R A K S R T W G K D G W Q K I V V C I I
gctgatgggcgaacaaaggttcatcctcgcgtgctcgacgcgttgggtccatgggttgc
A D G R T K V H P R V L D A L A A M G C
taccaagagggtatcgccaagaacacggtcaacgaaaaggaggtcaccgcgcacgtctac
Y Q E G I A K N T V N E K E V T A H V Y
gaatacaccactcaggtctcgttgaactcgggcctcagattcaagggcgagagaagggga
E Y T T Q V S L D S G L R F K G A E K G
attgttcttgcagatcatcttctgtctgaaggaaaagaaccagaagaagctgaactcg
I V P C Q I I F C L K E K N Q K K L N S
cacagatggttctttaatgcctttgggcgcgcttgaaccctaacatttgcattcttctg
H R W F F N A F G R A L N P N I C I L L
gacgttgggtaccaagcctggttccaaagccctctactaccttgggaaggctttcgacacg
D V G T K P G S K A L Y Y L W K A F D T
gactccagcgttgcgtggtgcggctggtgaaatcaaagctggcaagggcaagggtggtc
D S S V A G A A G E I K A G K G K G W L
ggtctcctgaaccccttgggtgcttct
G L L N P L V A S

Clone 11

gagatcgacttcactcgcacccatgcacggcgatgcggaatatttcgcacttctgctcc
E I D F T R T M H G V M R N I S H F C S
cgcgccaaaagcaggacttggggaaaagatggatggcaaaaaattgtggtctgcatcatc
R A K S R T W G K D G W Q K I V V C I I
gctgatgggcgaacaaaggttcctcgcgtgctcgacgcgttggctgccatgggtgc
A D G R T K V H P R V L D A L A M G C
taccaagaggcatcgccaagaacacggtcaacgaaaaggaggtcaccgcgcacgtctac
Y Q E G I A K N T V N E K E V T A H V Y
gaatacaccactcaggtctcgccttgactcggacctcagattcaagggcgagaaaagga
E Y T T Q V S L D S D L R F K G A E K G
attgttccttgccagatcatcttctgtctgaaggaagagaaccagaagaagctgaactcg
I V P C Q I I F C L K E E N Q K K L N S
cacagatgggttctttaatgcctttgggcgcgccttgaaccctaacatttgcattcttctg
H R W F F N A F G R A L N P N I C I L L
gacgttggtaccaagcctggttccaaagcctctactacctttggaaggctttcgacacg
D V G T K P G S K A L Y Y L W K A F D T
gactccagcgttgctgggtgcggctgggtgaaatcaaagctggcaagggcaagggatggctc
D S S V A G A A G E I K A G K G K G W L
ggtttctgaacccttggttgcttct
G F L N P L V A S

Clone 18

gagatcgacttcactcgcacccatgcacggcgatgcggaatatttcgcacttctgctcc
E I D F T R T M H G V M R N I S H F C S
cgcgccaaaagcaggacttggggaaaagatggatggcaaaaaattgtgatctgcatcatc
R A K S R T W G K D G W Q K I V I C I I
gctgatgggcgaacaaaggttcctcgcgtgctcgacgcgttggctgccatgggtgc
A D G R T K V H P R V L D A L A A M G C
taccaagaggcatcgccaagaacacggtcaacgaaaaggaggtcaccgcgcacgtctac
Y Q E G I A K N T V N E K E V T A H V Y
gaatacaccactcaggtctcgccttgactcggacctcagattcaagggcgagagaagga
E Y T T Q V S L D S D L R F K G A E K G
attgttccttgccagatcatcttctgtctgaaggaaaagaaccagaagaagctgaactcg
I V P C Q I I F C L K E K N Q K K L N S
cacagatgggttctttaatgcctttgggcgcgccttgaaccctaacatttgcattcttctg
H R W F F N A F G R A L N P N I C I L L
gacgttggtaccaagcctggttccaaagctctctactacctttggaaggctttcgacacg
D V G T K P G S K A L Y Y L W K A F D T
gactccagcgttgctgggtgcggctgggtgaaatcaaagctggcaagggcaagggatggctc
D S S V A G A A G E I K A G K G K G W L
ggctctctgaacccttggttgcttct
G L L N P L V A S

Clone 25

aagggttctgacgtccagaacgcttccaggtgttatgcagaacatccgcgatattgtcaac
K V L T S R T L H G V M Q N I R D I V N
ctgaagaagtcaggttctggaacaagggtggtccggcctggcaaaagattgtcgtgtgc
L K K S E F W N K G G P A W Q K I V V C
ttggtcttcgacgggtatcgaccctgcgacaagggcagctcgacgtcctcgccaccatt
L V F D G I D P C D K G T L D V L A T I
ggtatctaccaggacggtgtcatgaagaggatcgacggcaaggagactactgacacg
G I Y Q D G V M K R D I D G K E T T A H
attttcgaatacacgaccagctgtctgttaccctccaccagcagctgatccgcccgcac
I F E Y T T Q L S V T P N Q Q L I R P H
gatgacagctccagcactctgccccggtgcagatgatgttctggttgaaagcagaagaac
D D S S S T L P P V Q M M F C L K Q K N
accaagaagatcaactctcaccggttggtcttactgctttcggcagaatcctcaaccct
T K K I N S H R W L F T A F G R I L N P
gaagttgttattctgattgatgcgggtaccaagcccgccccaagtcctgctcgcgctt
E V V I L I D A G T K P G P K S L L A L
tgggaggtttctacaacgacaaggatctcgggtggtgcctgtggtgaaattcacgccatg
W E A F Y N D K D L G G A C G E I H A M
ttgggcaagggctggaaggatctcgtcaaccgctcatcgccgct
L G K G W K D L V N P L I A A

Clone 30

```

gatgagctttttgcgcgaaactttgaccggtgtgatcaagaacatcgagtacatgaactcg
D E L F A R T L T G V I K N I E Y M N S
cggacgaatagcaaaacatggggaaggatgcgtggaagaagatcggtgttgcgttgc
R T N S K T W G K D A W K K I V V C V V
agcgacggtcgtgcgaagatcaacccgaggacaagagccgttttggccggtctgggagtt
S D G R A K I N P R T R A V L A G L G V
taccaggacggcattgccaacagcaagtcaacggcaaggaggtgacggcacatatttac
Y Q D G I A K Q Q V N G K E V T A H I Y
gagtacacctcccaaatagagcctggaaatcaagaagggtgtcgtgaacatcaagaagggc
E Y T S Q M S L E I K K G V V N I K K G
accactcccattcagatgttgttctgtttgaaggaaaagaaccagaagaagatcaactcg
T T P I Q M L F C L K E K N Q K K I N S
cacagatgggtttttccaggcttttggcagcgttctcgaccccaacatttgcgtctcatc
H R W F F Q A F G S V L D P N I C V L I
gatgccggtacgaaacccggaaggactcgatttaccaactctggaaggcattcgacctg
D A G T K P G K D S I Y Q L W K A F D L
gagccaatgtgcccggcgcttgtggtgagatcaaggctatgttggtccacggcaagaag
E P M C A G A C G E I K A M L V H G K K
ctgctcaaccccttgttgcgacc
L L N P L V A T

```

Figura 12. Sequências nucleotídicas e sequências de a.a. deduzidas dos fragmentos do gene que codifica para a sintetase da quitina em *B. dothidea* e *B. corticis*.

3.6 Alinhamento de sequências

3.6.1 Alinhamento de sequências de aminoácidos

As sequências de a.a. deduzidas dos fragmentos do gene de sintetase da quitina, de ambas as estirpes, foram alinhadas com outras sequências de a.a. de sintetase da quitina de diferentes fungos (Fig. 13). Na tabela I apresenta-se a listagem dos referidos fungos, assim como o código utilizado para referenciar cada um dos genes. Para cada espécie, excepto a *S. cerevisiae*, as duas primeiras letras do código correspondem ao seu nome. Apresenta-se também, para cada sequência o seu código de acesso do GenBank.

A partir do alinhamento das diferentes sequências de a.a. foi gerado um dendrograma (Fig. 14). A visualização e arranjo gráfico do dendrograma foram realizados através do recurso ao programa TREEVIEW, também disponível na Internet. Observando este dendrograma é possível distinguir as três diferentes classes de sintetase da quitina, pois as sequências pertencentes a cada classe agrupam conjuntamente em ramos diferentes.

As diferentes classes de sintetase da quitina descritas anteriormente podem também ser distinguidas com base numa inspecção visual do alinhamento das várias sequências de a.a. (Fig. 15), pois estas diferenciam-se com base em “gaps” e resíduos característicos (Bowen *et al.*, 1992).

Tabela I: Lista das espécies de fungos e respectivos genes de sintetase de quitina utilizados no alinhamento de sequências de aminoácidos.

Espécie	Gene/Código	N.º acesso GenBank
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CHS1	M14045
	CHS2	M23865
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	SpCHS1	M82957
<i>Emmericella</i> (<i>Aspergillus</i>) <i>nidulans</i>	AdCHS1	M82938
	AdCHS2	M82939
<i>Aspergillus niger</i>	AnCHS1	M82940
	AnCHS2	M82941
<i>Ajellomyces</i> (<i>Blastomyces</i>) <i>dermatitidis</i>	BdCHS1	M82942
	BdCHS2	M82943
<i>Ajellomyces</i> (<i>Histoplasma</i>) <i>capsulatus</i>	HcCHS1	M82947
	HcCHS2	M82948
	HcCHS3	M82949
<i>Neurospora crassa</i>	NcCHS1	M82950
	NcCHS2	M82951
	NcCHS3	M73437
<i>Ustilago maydis</i>	UmCHS1	M82958
	UmCHS2	M82959
<i>Schizophyllum commune</i>	ScCHS1	M82956
<i>Candida albicans</i>	CaCHS1	X52420
	CaCHS2	M82937
<i>Exophiala jeikei</i>	EjCHS1	M82944
	EjCHS2	M82945
	EjCHS3	M82946
<i>Phaeococcus exophialae</i>	PeCHS1	M82952
	PeCHS2	M82953
<i>Rhinocladiella atrovirens</i>	RaCHS1	M82954
	RaCHS2	M82955
<i>Wangiella dermatitidis</i>	WdCHS1	M81905
	WdCHS2	M81906
	WdCHS3	M81907
<i>Xylohypha bantiana</i>	XbCHS1	M82960
	XbCHS2	M82961
<i>Phialophora verrucosa</i>	PvCHS1	L37685
	PvCHS2	L37686
<i>Magnaporthe grisea</i>	MgCHS1	X96413
	MgCHS2	X96414
	MgCHS3	X96415
<i>Sporothrix schenckii</i>	SsCHS1	L24908
	SsCHS2	L24909
	SsCHS3	L24911
<i>Botrytis cinerea</i>	BcCHS1	X77937
<i>Metarhizium anisopliae</i>	MaCHS1	U93265
	MaCHS2	U93266
	MaCHS3	U93267

CHS2	KYSLARTIHSIMKNVAHLCKREKSHVWGP-----NGWKKVSVILISDGRAKVNQGSGLDY	54	C L A S S E II
CaCHS1	EVAFARTMHGVMKNIAHLCSRHSKSIWKG-----DSWKKVQVLIIVADGRNKVQGSVLEL	54	
Anchs2	EIGFTRTLHGVMQNITHLCSRKSRTWGK-----DGWKKIVVCIADGRKKVHPRTLNA	54	
Adchs2	ETHFTRTMHGVMQNI SHFCRSRSKSRTWGK-----DGWKKIVVCIISDGRKKVHPRTLNA	54	
BdCHS2	EIHFTTRTMHGIMRNITHFCRSRTKSRTWGK-----DGWQKIVVCIADGRQKVHPRTLNA	54	
HcCHS3	EIHFTTRTMHGIMANITHFCRSRTKSRTWGK-----DGWQKIVVCIADGRQKVHPRTLNA	54	
WdCHS1	EIEFTTRTMHGIMRNIAHFCRSRTSRRTWGK-----DGWQKIVVCVIADGRQKVHPRTLNA	54	
XbCHS2	EIEFTTRTMHGIMRNISHFCRSRTKSRTWGK-----DGWQKIVVCVIADGRQKVHPRTLNA	54	
EjCHS2	EIEFTTRTMHGIMRNISHFCRSRTKSRTWGK-----DGWQKIVVCVIADGRQKVHPRTLNA	54	
PeCHS2	EIEFTTRTMHGIMRNISHFCRSRTKSRTWGK-----DGWPKIVVCVIADGRQKVHPRTLNA	54	
PvCHS2	EIEFTTRTMHGIMRNISHFCRSRTKSRTWGK-----DGWQKIVVCIADGRQKVHPRTLNA	54	C L A S S E I
B.dothidea.9-II	EIDFTRTMHGVMRNISHFCRSRAKSRTWGK-----DGWQKIVVCIADGRTKVHPRLVDA	54	
B.corticis.11-II	EIDFTRTMHGVMRNISHFCRSRAKSRTWGK-----DGWQKIVVCIADGRTKVHPRLVDA	54	
B.corticis.18-II	EIDFTRTMHGVMRNISHFCRSRAKSRTWGK-----DGWQKIVVCIADGRTKVHPRLVDA	54	
B.dothidea.32-II	EIDFTRTMHGVMRNISHFCRSRAKSRTWGK-----DGWQKIVVCIADGRTKVHPRLVDA	54	
B.corticis.10-II	EIDFTRTMHGVMRNISHFCRSRAKSRTWGK-----DGWQKIVVCIADGRTKVHPRLVDA	54	
NcCHS2	EFGFTRTMHVMKNISHFCRSRNSKRTWGA-----DGWQKIVVCVSDGREIHPRTLDA	54	
SsCHS2	AYDFTRTMHVMKNIAHFCGRNSKRTWGK-----HGWQKIVVCIVSDGRERHPRTVDA	54	
MgCHS1	EYDFTRTMHVMKNISHFCRRSKSRTWGE-----NGWQKIVVCIVSDGREIHPRTLDA	54	
MaCHS2	EICFTRTTHAVMKNISHFCRSRNSKRTWGE-----NGWQKIVVCIISDGRKINHPRTLDA	54	C L A S S E I
UmCHS2	DVLFARTMGGVIKNIHLCSRTRSKTWGP-----DAWKKVVVIIVADGRKKANERMLKA	54	
ScCHS1	EELFCRTMHGVIKNIHLCKRDRSKTWGK-----EGWKKVVVCIVSDGRQKINSRTLSV	54	
SpCHS1	EVLFARTMHSMKNISHLCSTRNSQVWGK-----DAWKKVVVCIISDGRTKIHPRTLAY	54	
EjCHS1	EFLFARTMIGVFKNIEYMCNRTSSKRTWGK-----EAWKKIVVCIVSDGRAKINHPRTAV	54	
PeCHS1	EFLFARTMIGVFKNIEYMCNRTSSKRTWGK-----EAWKKIVVCIVSDGRAKINTRTRAV	54	
RaCHS1	EFLFARTMIGVFKNIEYMCNRTSSKRTWGK-----EAWKKIVVCIVSDGRAKINPRTRAV	54	
WdCHS2	EFLFARTMIGVFKNIEYMCNRTSSKRTWGK-----EAWKKIVVCIVSDGRAKINPRTRAV	54	
PvCHS1	EFLFARTMIGVFKNIEYMCNRTSSKRTWGK-----EAWKKIVVCIVSDGRAKINPRTRAV	54	
XbCHS1	DFLFARTMIGVFKNIEIMCNKGSSQRTWGK-----EAWKKIVVCIVSDRRAKINPRTRAV	54	
Anchs1	DFLFARTMIGVFKNIEYMCNRTSSKRTWGK-----DAWKKIVVCIVSDGRAKINPRTRAV	54	C L A S S E I
Adchs1	DFLFARTMIGVFKNIEYMCNRTSSKRTWGK-----DAWKKIVVCIVSDGRAKINPRTRAV	54	
BdCHS1	DFLFARTMIGVFKNIEYMCNRTSSKRTWGK-----DAWKKIVVCIVSDGRAKINPRTRAV	54	
HcCHS1	DFLFARTMIGVFKNIEYMCNRTSSKRTWGK-----DAWKKIVVCIVSDGRAKINPRTRAV	54	
PcCHS	DFLFARTMIGVFKNIEYMCNRTSSKRTWGK-----DAWKKIVVCIVSDGRAKINPRTRAV	54	
B.corticis.2-I	DELFARTLTGVIKNIEYMNSRTNSKRTWGK-----DAWKKIVVCIVSDGRAKINPRTRAV	54	
B.corticis.30-I	DELFARTLTGVIKNIEYMNSRTNSKRTWGK-----DAWKKIVVCIVSDGRAKINPRTRAV	54	
B.dothidea.6-I	DELFARTLTGVIKNIEYMNSRTNSKRTWGK-----DAWKKIVVCIVSDGRAKINPRTRAV	54	
B.dothidea.30-I	DELFARTLTGVIKNIEYMNSRTNSKRTWGK-----DAWKKIVVCIVSDGRAKINPRTRAV	54	
B.dothidea.27-I	DELFARTLTGVIKNIEYMNSRMNSKRTWGK-----DAWKKIVVCIVSDGRAKINPRTRAV	54	
B.dothidea.28-I	DELFARTLTGVIKNIEYMNSRMNSKRTWGK-----DAWKKIVVCIVSDGRAKINPRTRAV	54	C L A S S E I
NcCHS1	EILFARTMIGVFKNIEYMCKRTESEKRTWGK-----DAWKKIVVCIVSDGRAKINPRTRAL	54	
SsCHS1	EILFARTMIGVFKNIEYMCKRNESEKRTWGK-----DAWKKIVVCIVSDGRAKINPRTRAL	54	
MgCHS3	EVLFARTMIGVFKNIEYMCKRPESKRTWGK-----EAWKKIVVCIVSDGRAKINPRTRAL	54	
MaCHS1	DILFARTMIGVFKNIEYMCNRPNSKRTWGK-----DAWKKIVVCIVSDGRAKINPRTKAI	54	
BcCHS1	DVLFARTMHGVFKNIEFMCTRKDSKRTWGK-----DAWKKIVVCIVSDGRAKINPRTRAV	54	
CHS1	HILLGRTLKGIMDNVYKVMVKKNSSTWGP-----DAWKKIVVCIISDGRSKINERSLAL	54	
CaCHS2	DILLGRTLKGIVFKNIKYLESKARSSTWGK-----DSWKKIVVCIVSDGRTKINERAQAL	54	
EjCHS3	KVLTARTLHGVMQNIRDIVNLKKSEFWNK----GGPAWQKIVVCLVFDGIDPCDKNTLDL	56	
RaCHS2	KVLTARTLHGVMQNIRDIVNLKKSEFWNK----GGPAWQKIVVCLVFDGIDPCDKNTLDV	56	
WdCHS3	KVLTARTLHGVMQNIRDIVNLKKSEFWNK----GGPAWQKIVVCLVFDGIDPCDKNTLDV	56	C L A S S E III
B.dothidea.1-III	KVLTARTLHGVMQNIRDIVNLKKSEFWNK----GGPAWQKIVVCLVFDGIDPCDKGTLDV	56	
B.dothidea.4-III	KVLTARTLHGVMQNIRDIVNLKKSEFWNK----GGPAWQKIVVCLVFDGIDPCDKGTLDV	56	
B.dothidea.17-III	KVLTARTLHGVMQNIRDIVNLKKSEFWNK----GGPAWQKIVVCLVFDGIDPCDKGTLDV	56	
B.dothidea.29-III	KVLTARTLHGVMQNIRDIVNLKKSEFWNK----GGPAWQKIVVCLVFDGIDPCDKGTLDV	56	
B.dothidea.31-III	KVLTARTLHGVMQNIRDIVNLKKSEFWNK----GGPAWQKIVVCLVFDGIDPCDKGTLDV	56	
B.corticis.5-III	KVLTARTLHGVMQNIRDIVNLKKSEFWNK----GGPAWQKIVVCLVFDGIDPCDKGTLDV	56	
B.corticis.25-III	KVLTARTLHGVMQNIRDIVNLKKSEFWNK----GGPAWQKIVVCLVFDGIDPCDKGTLDV	56	
HcCHS2	KMLTSRTLHGVMQNIRDIVNLKKSEFWNK----GGPAWQKIAVCLVFDGIDPCDKDTLDV	56	
NcCHS3	KVLLSRTLHSMVTNIRDIVNLKKSSFWNK----GGPAWQKIVVCLVFDGLDKTDKNVLDV	56	
SsCHS3	KVLLSRTLHGVMQNIRDIVNLKKSTFWNK----GGPAWQKIVVCLVFDGLEKADKNVLDV	56	C L A S S E III
MgCHS2	KVLLSRTLHGVMQNIRDIVSLKKSTFWNK----GGPAWQKIVVCLVFDGIEKTDKNVLDV	56	
MaCHS3	KVLLSRTLHGVMQNIRDIVNLKKSTFWNK----GGPAWQKIVVCLVFDGIEKADKSTLDV	56	
UmCHS1	RILLARTLHGVMNLNIRDICKSKSKFWRRSAEEGRPGWRIVVSLIFDIDPCDEEVLDL	60	

* . : : * : : * . * : : : . *

CHS2	LAALGVYQEDMAKASVNGDPVKAHIFELTTQVSIN---ADLDYVS--KD----IVPVQLV	105	C L A S S E II
CaCHS1	LTATGCVQENLARPYPVNSKVNHLFEYTTQISID---ENLKFKGDEKN----LAPVQVL	107	
Anchs2	LAALGVYQEGIAKNVNVNQKVNAHVYETTTQVSLD---PDLKFKGAEGK----IMPCQVL	107	
Adchs2	LAALGVYQEGIAKNVNVNQKVNAHVYETTTQVSLD---SDLKFKGAEGK----IVPCQVI	107	
BdCHS2	LAAMGVYQDGIKNIIVNQKPVNAHVYETTTQVSLD---PDLKFKGAEGK----YKPCQII	107	
HcCHS3	LAAMGVYQDGIKNIIVNQKPVNAHVYETTTQVSLD---PDLKFKGAEGK----IMPCQII	107	
WdCHS1	LAAMGVYQDGIKNIIVNQKPVNAHVYETTTQVSLD---ETLKFKGAEGK----IVPCQMI	107	
XbCHS2	LAAMGVYQDGIKNIIVNQKPVNAHVYETTTQVSLD---ETLKFKGAEGK----TVPCQDV	107	
EjCHS2	LAALGVYQDGIKNIIVNQKPVNAHVYETTTQVSLD---EGMKFKGAEGK----IVPCQMI	107	
PeCHS2	LAALGVYQDGIKNIIVNQKPVNAHVYETTTQVSLD---EGMKFKGAEGK----IVPCQMI	107	
PvCHS2	LAALGVYQDCIAKTLNVNQKEVRAHVYETTTQVSLD---EGLKFKGAEGK----IVPCQMI	107	C L A S S E I
B.dothidea.9-II	LAAMGCYQEGIAKNTVNEKEVTAHVYETTTQVSLD---SDLRFKGAEGK----IVPCQII	107	
B.corticis.11-II	LAAMGCYQEGIAKNTVNEKEVTAHVYETTTQVSLD---SDLRFKGAEGK----IVPCQII	107	
B.corticis.18-II	LAAMGCYQEGIAKNTVNEKEVTAHVYETTTQVSLD---SDLRFKGAEGK----IVPCQII	107	
B.dothidea.32-II	LAAMGCYQEGIAKNTVNEKEVTAHVYETTTQVSLD---SDLRFKGAEGK----IVPCQII	107	
B.corticis.10-II	LAAMGCYQEGIAKNTVNEKEVTAHVYETTTQVSLD---SGLRFKGAEGK----IVPCQII	107	
NcCHS2	LAAMGVYQHGIKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---SDLMFKGAEGK----IVPCQMI	107	
SsCHS2	LAAMGIYQHGIKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---SDLKFKGAEGK----IVPCQMI	107	
MgCHS1	LAAMGVYQHGIKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---ADLKFKGAEGK----IVPCQML	107	
MaCHS2	LAAMGVYQHGIKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---ADLKFKGAEGK----IVPCQMI	107	C L A S S E I
UmCHS2	LGLMGCYNEGVMKDHVLKPPVEAHIFEYTTTRVQIT---EKGEVKVT-----PCPIQVV	104	
ScCHS1	IAAMGRHQDGIKNIIVNQKPVTAHIYEYTTQITVT---PSMKIEGAERG----TMPVQLI	107	
SpCHS1	LAAIGVYQDGIKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---PNLKFKGSDRG----IVPVQMI	107	
EjCHS1	LAGLGVYQDGIKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---LKGTVQSLKPRS----ATPVQLL	108	
PeCHS1	LAGLGVYQDGIKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---LKGTVQSLKPRS----ATPVQLL	108	
RaCHS1	LAGLGVYQDGIKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---LKGTVQSLKPRS----ATPVQLL	108	
WdCHS2	LAGLGVYQDGIKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---LKGTVQSLKPRS----ATPVQLL	108	
PvCHS1	LAGLGVYQDGIKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---LKGTVQSLKPRS----ATPVQLL	108	
XbCHS1	LAGLGVYQDGIKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---LKGTVQSLKPRS----ATPVQLL	108	
Anchs1	LAGLGCYQDGIKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---LKGTVQSLKPRS----GCPVQMI	108	C L A S S E III
Adchs1	LAGLGCYQDGIKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---LKGTVQSLKPRS----GCPVQMI	108	
BdCHS1	LAGLGVYQDGIKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---LKGTVQSLKPRS----GCPVQMI	108	
HcCHS1	LAGLGVYQDGIKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---LKGTVQSLKPRS----GCPVQMI	108	
PeCHS	LAGLGVYQDGIKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---LKGTVQSLKPRS----GCPVQMI	108	
B.corticis.2-I	LAGLGVYQDGIKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---LKGTVQSLKPRS----GCPVQMI	107	
B.corticis.30-I	LAGLGVYQDGIKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---LKGTVQSLKPRS----GCPVQMI	107	
B.dothidea.6-I	LAGLGVYQDGIKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---LKGTVQSLKPRS----GCPVQMI	107	
B.dothidea.30-I	LAGLGVYQDGIKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---LKGTVQSLKPRS----GCPVQMI	107	
B.dothidea.27-I	LAGLGVYQDGIKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---LKGTVQSLKPRS----GCPVQMI	107	
B.dothidea.28-I	LAGLGVYQDGIKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---LKGTVQSLKPRS----GCPVQMI	107	C L A S S E III
NcCHS1	LAGMGVYQEGIAKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---LKGTVQSLKPRS----GCPVQMI	107	
SsCHS1	LAGMGVYQEGIAKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---LKGTVQSLKPRS----GCPVQMI	107	
MgCHS3	LAGLGVYQEGIAKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---LKGTVQSLKPRS----GCPVQMI	107	
MaCHS1	LAGMGVYQEGIAKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---LKGTVQSLKPRS----GCPVQMI	107	
BcCHS1	LAGLGVYQDGIKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---LKGTVQSLKPRS----GCPVQMI	107	
CHS1	LSSLGCYQDGFADKDEINEKKVAMHVYETTTMINITNISESEVSELECNQG----TVPIQLL	110	
CaCHS2	LAGLGVYQEGIAKNIIVNQKAVQAHVYETTTQVSLD---LKGTVQSLKPRS----GCPVQMI	109	
EjCHS3	LATVGIYQDGVMMKDDVDGKDTVAHIFEYTTQLSVT---PNQQLIRPNDNDSTSLPPVQMI	113	
RaCHS2	LATVGIYQDGVMMKDDVDGKDTVAHIFEYTTQLSVT---PNQQLIRPNDNDSTSLPPVQMI	113	
WdCHS3	LATVGIYQDGVMMKDDVDGKDTVAHIFEYTTQLSVT---PNQQLIRPNDNDSTSLPPVQMI	113	
B.dothidea.1-III	LATIGIYQDGVMMKDDVDGKDTVAHIFEYTTQLSVT---PNQQLIRPNDNDSTSLPPVQMI	113	
B.dothidea.4-III	LATIGIYQDGVMMKDDVDGKDTVAHIFEYTTQLSVT---PNQQLIRPNDNDSTSLPPVQMI	113	
B.dothidea.17-III	LATIGIYQDGVMMKDDVDGKDTVAHIFEYTTQLSVT---PNQQLIRPNDNDSTSLPPVQMI	113	
B.dothidea.29-III	LATIGIYQDGVMMKDDVDGKDTVAHIFEYTTQLSVT---PNQQLIRPNDNDSTSLPPVQMI	113	
B.dothidea.31-III	LATIGIYQDGVMMKDDVDGKDTVAHIFEYTTQLSVT---PNQQLIRPNDNDSTSLPPVQMI	113	
B.corticis.5-III	LATIGIYQDGVMMKDDVDGKDTVAHIFEYTTQLSVT---PNQQLIRPNDNDSTSLPPVQMI	113	
B.corticis.25-III	LATIGIYQDGVMMKDDVDGKDTVAHIFEYTTQLSVT---PNQQLIRPNDNDSTSLPPVQMI	113	
HcCHS2	LATIGIYQDGVMMKDDVDGKDTVAHIFEYTTQLSVT---PNQQLIRPNDNDSTSLPPVQMI	113	
NcCHS3	LATIGIYQDGVMMKDDVDGKDTVAHIFEYTTQLSVT---PNQQLIRPNDNDSTSLPPVQMI	113	
SsCHS3	LATIGIYQDGVMMKDDVDGKDTVAHIFEYTTQLSVT---PNQQLIRPNDNDSTSLPPVQMI	113	
MgCHS2	LATIGIYQDGVMMKDDVDGKDTVAHIFEYTTQLSVT---PNQQLIRPNDNDSTSLPPVQMI	113	
MaCHS3	LATVGVYQDGVMMKDDVDGKDTVAHIFEYTTQLSVT---PNQQLIRPNDNDSTSLPPVQMI	113	
UmCHS1	LATVGVYQDGVMMKDDVDGKDTVAHIFEYTTQLSVT---PNQQLIRPNDNDSTSLPPVQMI	117	
	: * : . . : : * : . : : *		

CHS2	FCLKEENKKKINSRHLFNAFCVLPVLTQPTVVTLVDVGTRLNNTAIYRLWKVFDMSNVAGA	165	C L A S S E II
CaCHS1	FCLKESNQKKINSRHLFNAFCVLPVLDPNVIVLLDVGTKPDNHAITYNLWKAFFDRDSNVAGA	167	
Anchs2	FCLKEHNKKKLNHRWFFNAFGRALQPNICILLDVGTKPAPTALYHLWKAFFDQNSNVAGA	167	
Adchs2	FCLKEHNQKKLNHRWFFNAFGRALQPNICILLDVGTRPEPTALYHLWKAFFDQNSNVAGA	167	
BdCHS2	FCLKERNEKKLNHRWFFNAFGRALTPNVCILLDVGTKPAPTALYHLWKAFFDQNSNVAGA	167	
HcCHS3	FCLKERNEKKLNHRWFFNAFGRALTPNVCILLDVGTKPGPTALYHLWKAFFDQNSNVAGA	167	
WdCHS1	FCLKEKNKKKLNHRWFFNAFGRALIPNVCILLDVGTKPDSKALYHLWKAFFDQNSNVAGA	167	
XbCHS2	FCLKEKNKKKLNHRWFFNAFGRALTPNVCILLDVGTKPDSKALYHLWKAFFDQNSNVAGA	167	
EjCHS2	FCLKEQNKKKLNHRWFFNAFGRALTPNVCILLDVGTKPDSKALYHLWKAFFDQNSNVAGA	167	
PeCHS2	FCLKEQNKRKLNHRWFFNAFGRALTPNVCILLDVGTKPDSKALYHLWKAFFDQNSNVAGA	167	
PvCHS2	FCLKEKNKKKLNHRWFFNAFGRALTPNVCILLDVGTKPDSKALYHLWKAFFDQNSNVAGA	167	C L A S S E I
B.dothidea.9-II	FCLKEKNQKKLNHRWFFNAFGRALNPNICILLDVGTKPGSKALYHLWKAFFDQNSNVAGA	167	
B.corticis.11-II	FCLKEENQKKLNHRWFFNAFGRALNPNICILLDVGTKPGSKALYHLWKAFFDQNSNVAGA	167	
B.corticis.18-II	FCLKEKNQKKLNHRWFFNAFGRALNPNICILLDVGTKPGSKALYHLWKAFFDQNSNVAGA	167	
B.dothidea.32-II	FCLKEKNQKKLNHRWFFNAFGRALNPNICILLDVGTKPGSKALYHLWKAFFDQNSNVAGA	167	
B.corticis.10-II	FCLKEKNQKKLNHRWFFNAFGRALNPNICILLDVGTRPGGTSYHLWKAFFDQNSNVAGA	167	
NcCHS2	FCLKERNQRKLNHRWFFNAFGRALNPNICILLDVGTRPGGNSLYHLWKAFFDQNSNVAGA	167	
SsCHS2	FCLKERNQRKLNHRWFFNAFGRALNPNICILLDVGTRPGGNSLYHLWKAFFDQNSNVAGA	167	
MgCHS1	FCLKEKNQKKLNHRWFFNAFGRALNPNICILLDVGTRPGGNSLYHLWKAFFDQNSNVAGA	167	
MaCHS2	FCLKEQNKKKLNHRWFFNAFCQMLKPNVCILLDVGTKPTGTSTYELWKSFDKHHRVGGA	164	
UmCHS2	FCLKEKNQKKINSRHWFFNAFGRILQPNVCVLLDVGTMGPSTYHLWKAFFDQNSNVAGA	167	C L A S S E I
ScCHS1	FCLKEKNQKKINSRHWFFNAFGRILQPNVCVLLDVGTMGPSTYHLWKAFFDQNSNVAGA	167	
SpCHS1	FCLKEKNQKKLNHRWFFNAFGRVLDPNICVLDAGTKPGKDSIYQLWKAFFDLEPMCAGA	167	
EjCHS1	FCLKEKNQKKINSRHWFFNAFGRVLDPNICVLDAGTKPGKDSIYQLWKAFFDLEPMCAGA	168	
PeCHS1	FCLKEKNQKKINSRHWFFNAFGRVLDPNICVLDAGTKPGKDSIYQLWKAFFDLEPMCAGA	168	
RaCHS1	FCLKEKNQKKINSRHWFFNAFGRVLDPNICVLDAGTKPGKDSIYQLWKAFFDLEPMCAGA	168	
WdCHS2	FCLKEKNQKKINSRHWFFNAFGRVLDPNICVLDAGTKPGKDSIYQLWKAFFDLEPMCAGA	168	
PvCHS1	FCLKEKNQKKINSRHWFFNAFGRVLDPNICVLDAGTKPGKDSIYQLWKAFFDLEPMCAGA	168	
XbCHS1	FCLKEKIRRKINSRHWFFNAFGRVLDPNICVLDAGTKPGKDSIYHLWKAFFDLEPMIGGA	168	
Anchs1	FCLKEKNQKKINSRHWFFNAFGRVLDPNICVLDAGTRPGKDSIYHLWKAFFDQNSNVAGA	168	
Adchs1	FCLKEKNQKKINSRHWFFNAFGRVLDPNICVLDAGTQPGKDSIYRLWKAFFDQNSNVAGA	168	C L A S S E III
BdCHS1	FCLKEKNQKKINSRHWFFNAFGRVLDPNICVLDAGTKPGRDSIYHLWKAFFDQNSNVAGA	168	
HcCHS1	FCLKEKNQKKINSRHWFFNAFGRVLDPNICVLDAGTKPGRDSIYHLWKAFFDQNSNVAGA	168	
PeCHS	FCLKEKNQKKINSRHWFFNAFGRILDPNICVLDAGTKPGKDSIYQLWKAFFDQNSNVAGA	168	
B.corticis.2-I	FCLKEKNQKKINSRHWFFNAFGRVLDPNICVLDAGTKPGKDSIYQLWKAFFDLEPMCAGA	167	
B.corticis.30-I	FCLKEKNQKKINSRHWFFNAFGRVLDPNICVLDAGTKPGKDSIYQLWKAFFDLEPMCAGA	167	
B.dothidea.6-I	FCLKEKNQKKINSRHWFFNAFGRVLDPNICVLDAGTKPGKDSIYQLWKAFFDLEPMCAGA	167	
B.dothidea.30-I	FCLKEKNQKKINSRHWFFNAFGRVLDPNICVLDAGTKPGKDSIYQLWKAFFDLEPMCAGA	167	
B.dothidea.27-I	FCLKEKNQKKINSRHWFFNAFGRVLDPNICVLDAGTKPGKDSIYQLWKAFFDLEPMCAGA	167	
B.dothidea.28-I	FCLKEKNQKKINSRHWFFNAFGRVLDPNICVLDAGTEPGGSSIYHLWKAFFDLD-----	161	
NcCHS1	FCLKEKNQKKINSRHWFFNAFGRVLDPNICVLDAGTRPGGNSIYHLWKAFFDLEPMCAGA	167	C L A S S E III
SsCHS1	FCLKEKNQKKINSRHWFFSAFGRVLDPNICVLDAGTKPGRDSIYHLWKAFFDQNSNVAGA	167	
MgCHS3	FCLKEKNQKKINSRHWFFSAFGRVLDPNICVLDAGTRPGGNSIYHLWKAFFDQNSNVAGA	167	
MaCHS1	FCLKEKNQKKINSRHWFFSAFGRVLDPNICVLDAGTRPGGNSIYHLWKAFFDQNSNVAGA	167	
BcCHS1	FCLKEKNQKKINSRHWFFSAFGRVLDPNICVLDAGTKPGKDSIYHLWKAFFDLEPMCAGA	167	
CHS1	FCLKEQNQKKINSRHWFAEGFAELLRPNIVTLLDAGTMGPKDSIYQLWREF-RNPNVGA	169	
CaCHS2	FCLKETNAKKINSRHWCFQAIGQVLDPKIVVLLDCGTQPSGRSLYELWKEFFDRDHRVGA	169	
EjCHS3	FCLKQKNSKKINSRHLFNGFGRILNPEVCILLDAGTKPGPKSLMALWEAFYNDKDLGGA	173	
RaCHS2	FCLKQKNSKKINSRHLFNGFGRILNPEVCILLDAGTKPGPKSLMALWEAFYNDKDLGGA	173	
WdCHS3	FCLKQKNSKKINSRHLFNAFGRILNPEVCILLDAGTKPGPKSLMALWEAFYNDKDLGGA	173	
B.dothidea.1-III	YCLKQKNTKKINSRHLFTAFAFRILNPEVVILIDAGTKPGPKSLMALWEAFYNDKDLGGA	173	C L A S S E III
B.dothidea.4-III	FCLKQKNTKKINSRHLFTAFAFRILNPEVVILIDAGTKPGPKSLMALWEAFYNDKDLGGA	173	
B.dothidea.17-III	FCLKQKNTKKINSRHLFTAFAFRILNPEVVILIDAGTKPGPKSLMALWEAFYNDKDLGGA	173	
B.dothidea.29-III	FCLKQKNTKKINSRHLFTAFAFRILNPEVVILIDAGTKPGPKSLMALWEAFYNDKDLGGA	173	
B.dothidea.31-III	FCLKQKNTKKINSRHLFTAFAFRILNPEVVILIDAGTKPGPKSLMALWEAFYNDKDLGGA	173	
B.corticis.5-III	FCLKQKNTKKINSRHLFTAFAFRILNPEVVILIDAGTKPGPKSLMALWEAFYNDKDLGGA	173	
B.corticis.25-III	FCLKQKNTKKINSRHLFTAFAFRILNPEVVILIDAGTKPGPKSLMALWEAFYNDKDLGGA	173	
HcCHS2	FCLKQKNSKKINSRHLFNAFGRILNPEVCILLDAGTKPGHKSLLALWEAFYNDKDLGGS	173	
NcCHS3	FCLKQKNTKKINSRHLFNAFGRILNPEVCILLDAGTKPSRSLMALWEGFYNDKDLGGA	173	
SsCHS3	FCLKQKNSKKINSRHLFNAFGRILNPEVCILLDAGTKPSRSLMALWEGFYNDKDLGGA	173	
MgCHS2	FCLKAKNSKKINSRHLFNAFGRILNPEVCILLDAGTKPSSRSLMALWEGFYNDKDLGGA	173	C L A S S E III
MaCHS3	FCLKQKNSKKINSRHLFNAFGRILNPEVTILIDAGTKPSRSLMALWEGFYNDKDLGGA	173	
UmCHS1	FCLKQKNSKKINSRHLFNAFGRILNPEVTILIDAGTKPGHKSLLALWEAFYNNANLGA	177	
	: * * : : : * * * * : * * : . * * : : * * *		

CHS2	AGQIKTMK-----GKWGLKLFNPLVAS-----	187	C L A S S E I I
CaCHS1	AGEIKAMK-----GKGWINLTNPLVAS-----	189	
Anchs2	AGEIKAGK-----GKGMLGLLNPLVAS-----	189	
Adchs2	AGEIKASK-----GKNMLGLLNPLVAS-----	189	
BdCHS2	AGEIKAGK-----GKGWLGFLNPLVAS-----	189	
HcCHS3	AGEIKAGK-----GKGWLGFLNPLVAS-----	189	
WdCHS1	AGEIKADK-----GKGWLGLLNPLVASQNFYK	196	
XbCHS2	AGEIKADK-----GKGWMGLLNPLVAS-----	189	
EjCHS2	AGEIKADK-----GKGWMCLLNPLVS-----	188	
PeCHS2	AGEIKADK-----GKGWLGLLNPLVAS-----	189	
PvCHS2	AGEIKADK-----GKGWMGLLNPLVAS-----	189	C L A S S E I
B.dothidea.9-II	AGEIKAGK-----GKGWLGLLNPLVAS-----	189	
B.corticis.11-II	AGEIKAGK-----GKGWLGFLNPLVAS-----	189	
B.corticis.18-II	AGEIKAGK-----GKGWLGLLNPLVAS-----	189	
B.dothidea.32-II	AGEIKAGK-----GKGWLGLLNPLVAS-----	189	
B.corticis.10-II	AGEIKAGK-----GKGWLGLLNPLVAS-----	189	
NcCHS2	CGEIKAMK-----GRFGGNLLNPLVAS-----	189	
SsCHS2	CGEIKAMK-----GRFGGNLLNPLVAS-----	189	
MgCHS1	CGEIKAMK-----GRLGQNLLNPLVAS-----	189	
MaCHS2	CGEIKAMK-----GRFGSNLLNPLVAS-----	189	
UmCHS2	CGEICVDT-----GRGCTALFNPLVAS-----	186	C L A S S E I
ScCHS1	CGEIVALK-----GKWGLNLLNPLVAA-----	189	
SpCHS1	CGEIVVMK-----GKLGSGLINPLVAT-----	189	
EjCHS1	CGEIKVML-----DHGKKLYNPLIAT-----	189	
PeCHS1	CGEIKVML-----DHGKKLYNPLIAT-----	189	
RaCHS1	CGEIKVML-----DHGKKLYNPLIAT-----	189	
WdCHS2	CGEIKVML-----DHGKKLLNPLVAT-----	189	
PvCHS1	CGEIKVML-----DKGKKLYNPLVAT-----	189	
XbCHS1	CGEIKVML-----EHGKKLYNPLVAT-----	189	
Anchs1	CGEIKVMX-----SHGKKLLNPLVAG-----	189	C L A S S E I
Adchs1	CGEIKVML-----DHGKKLFNPLVAG-----	189	
BdCHS1	CGEIKTML-----SHGKKLINPLVAA-----	189	
HcCHS1	CGEIKAML-----SHGKKLINPLIA-----	188	
PcCHS	CGEIKVML-----SHGKKLLNPLVAT-----	189	
B.corticis.2-I	CGEIKAML-----VHGKKLLNPLVAT-----	188	
B.corticis.30-I	CGEIKAML-----VHGKKLLNPLVAT-----	188	
B.dothidea.6-I	CGEIKAML-----VHGKKLLNPLVAT-----	188	
B.dothidea.30-I	CGEIKAML-----VHGKKLLDPLLR-----	187	
B.dothidea.27-I	CGEIKAML-----VHGKKLLNPLVAT-----	188	
B.dothidea.28-I	CGEIKAML-----VHGKKLLNPLVAA-----	188	C L A S S E I
NcCHS1	-----	-----	
SsCHS1	CGEIKAML-----GPGGKYLVNPLVAA-----	189	
MgCHS3	CGEIKAMLGSKFPQPPQSYSNTSQLTXKQIGTGKKNLPLVAA-----	210	
MaCHS1	CGEIKAML-----GTGGKNLINPLVAT-----	189	
BcCHS1	CGEIKAML-----GPGGKNLVNPLVAT-----	189	
CHS1	CGEIRTDL-----GKRFFVKLLNPLVAS-----	191	
CaCHS2	CGEITTSI-----KKR-QMITNPLVAS-----	190	
EjCHS3	CGEIHAMLGRGG-----VFGRKLLNPLVAA-----	198	
RaCHS2	CGEIHAMLGRGG-----VFGRKLLNPLVAA-----	198	C L A S S E I
WdCHS3	CGEIHAMLGPGG-----VFGRKL-----	191	
B.dothidea.1-III	CGEIHAMLGKG-----WKNLVNPLIAA-----	195	
B.dothidea.4-III	CGEIHAMLGKG-----WKNLVNPLIAA-----	195	
B.dothidea.17-III	CGEIHAMLGKG-----WKNLVNPLIAA-----	195	
B.dothidea.29-III	CGEIHAMLGKG-----WKNLVNPLIAA-----	195	
B.dothidea.31-III	CGEIHAMLGKG-----WKNLVNPLIAA-----	195	
B.corticis.5-III	CGEIHAMLGKG-----WKNLVNPLIAA-----	195	
B.corticis.25-III	CGEIHAMLGKG-----WKDLVNPLIAA-----	195	
HcCHS2	CGEIHAMLGKG-----WKNLINPLVA-----	194	C L A S S E I
NcCHS3	CGEIHAMLGKG-----GKKLLNPLVAV-----	195	
SsCHS3	CGEIHAMLGKG-----GRKLLNPLVAV-----	195	
MgCHS2	CGEIHAMLGKG-----GRKLLNPLVAV-----	195	
MaCHS3	CGEIHAMLGKG-----GKKLFNPLVAV-----	195	
UmCHS1	CGEIHAMIKNG-----RKLINPLVAA-----	198	C L A S S E I

Figura 13. Alinhamento das sequências de a.a deduzidas dos fragmentos de sintetase da quitina de diferentes espécies de fungos, com os vários clones de *Botryosphaeria* spp. Um asterisco indica identidade completa naquela posição, em todos os fragmentos. Dois pontos indicam substituições conservativas e um ponto indica substituições semi-conservativas.

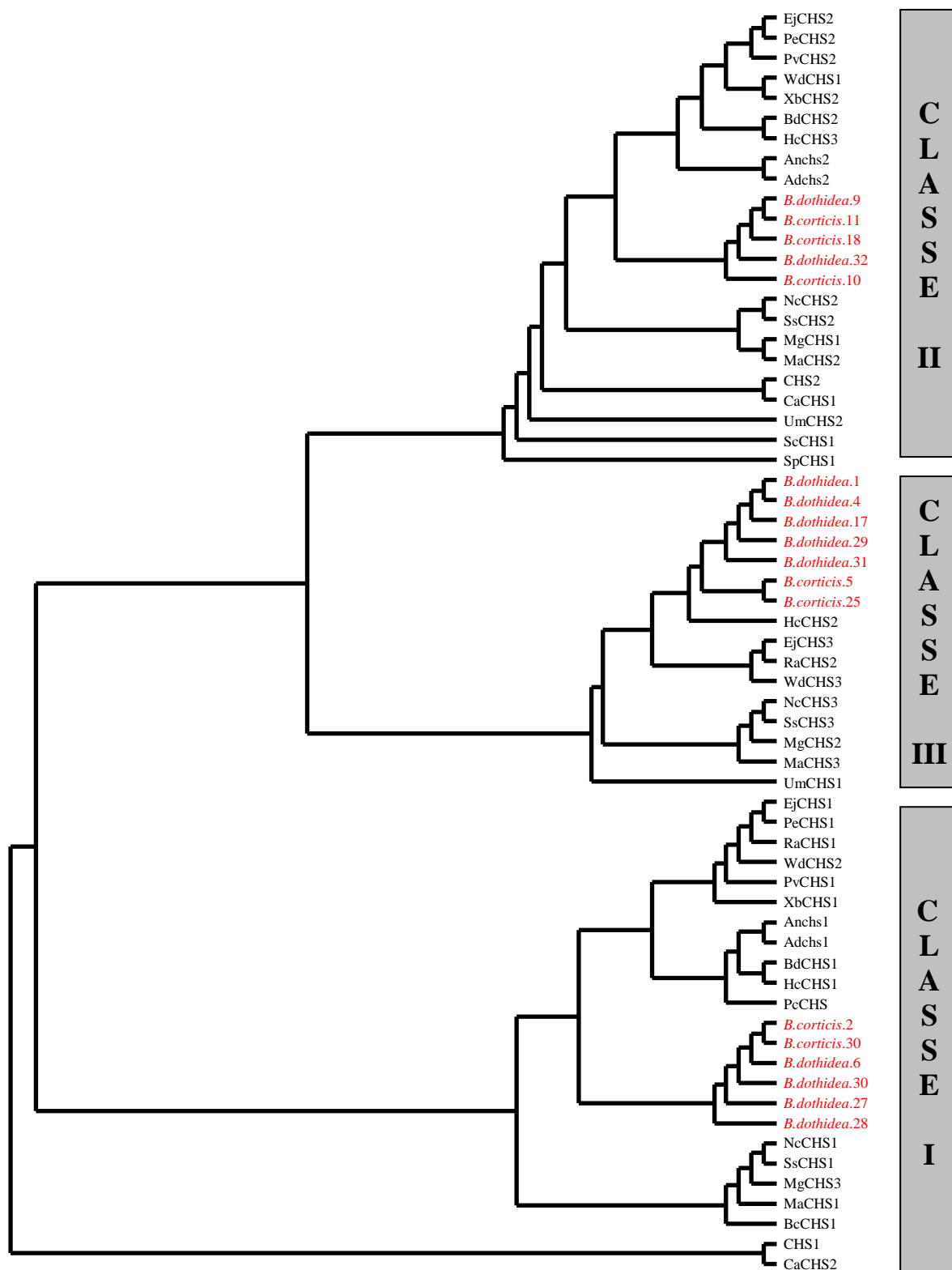


Figura 14. Dendrograma que mostra as diferentes classes de sintetase da quitina. O dendrograma foi calculado e gerado pelo programa Clustal W2 a partir das sequências de a.a. deduzidas.

3.6.2 Alinhamento das sequências por classes

As sequências nucleotídicas (Fig. 15), bem como as sequências de a.a. deduzidas (Fig. 16) dos fragmentos anteriores foram alinhadas, utilizando para tal o programa Clustal W2, disponível na Internet. Verificou-se que tanto as sequências nucleotídicas, como as sequências de a.a. deduzidas apresentam uma grande identidade entre si.

Atentando as sequências é possível observar que no mesmo isolado e dentro da mesma classe existem sequências ligeiramente diferentes. Relativamente às sequências de a.a. é de notar que a classe I alberga três sequências diferentes entre si (*B. dothidea*27, *B. dothidea*6 e *B. dothidea*30) e a classe III acolhe igualmente três sequências diferentes, *B. dothidea*4, *B. dothidea*31 e *B. corticis*5 que é diferente da outra sequência da mesma espécie. As sequências nucleotídicas correspondentes apresentam mais sequências diferentes dado que existem vários codões que codificam o mesmo a.a. Outras das diferenças observadas correspondem a substituições conservativas e semi-conservativas.

Classe I

<i>B.corticis</i> .2-I	GATGAGCTTTTTCGCGAACTTTGACCGGTGTGATCAAGAACATCGAGTACATGAACTCG	60
<i>B.corticis</i> .30-I	GATGAGCTTTTTCGCGAACTTTGACCGGTGTGATCAAGAACATCGAGTACATGAACTCG	60
<i>B.dothidea</i> .30-I	GATGAGCTTTTTCGCGAACTTTGACCGGTGTGATCAAGAACATCGAGTACATGAACTCG	60
<i>B.dothidea</i> .28-I	GATGAGCTTTTTCGCGAACTTTGACCGGTGTGATCAAGAACATCGAGTACATGAACTCG	60
<i>B.dothidea</i> .6-I	GATGAGCTTTTTCGCGAACTTTGACCGGTGTGATCAAGAACATCGAGTACATGAACTCG	60
<i>B.dothidea</i> .27-I	GATGAGCTTTTTCGCGAACTTTGACCGGTGTGATCAAGAACATCGAGTACATGAACTCG	60

<i>B.corticis</i> .2-I	CGGACGAATAGCAAAACATGGGGTAAGGATGCGTGGAAGAAGATCGTGGTTTGCCTTGTC	120
<i>B.corticis</i> .30-I	CGGACGAATAGCAAAACATGGGGTAAGGATGCGTGGAAGAAGATCGTGGTTTGCCTTGTC	120
<i>B.dothidea</i> .30-I	CGGACGAATAGCAAAACATGGGGTAAGGATGCGTGGAAGAAGATCGTGGTTTGCCTTGTC	120
<i>B.dothidea</i> .28-I	CGGACGAATAGCAAAACATGGGGTAAGGATGCGTGGAAGAAGATCGTGGTTTGCCTTGTC	120
<i>B.dothidea</i> .6-I	CGGACGAATAGCAAAACATGGGGTAAGGATGCGTGGAAGAAGATCGTGGTTTGCCTTGTC	120
<i>B.dothidea</i> .27-I	CGGATGAATAGCAAAACATGGGGTAAGGATGCGTGGAAGAAGATCGTGGTTTGCCTTGTC	120
**** *		
<i>B.corticis</i> .2-I	AGCGACGGTCGTGCGAAGATCAACCCGAGGACAAGAGCCGTTTTGGCCGGTCTGGGAGTT	180
<i>B.corticis</i> .30-I	AGCGACGGTCGTGCGAAGATCAACCCGAGGACAAGAGCCGTTTTGGCCGGTCTGGGAGTT	180
<i>B.dothidea</i> .30-I	AGCGACGGTCGTGCGAAGATCAACCCGAGGACAAGAGCCGTTTTGGCCGGTCTGGGAGTT	180
<i>B.dothidea</i> .28-I	AGCGACGGTCGTGCGAAGATCAACCCGAGGACAAGAGCCGTTTTGGCCGGTCTGGGAGTT	180
<i>B.dothidea</i> .6-I	AGCGACGGTCGTGCGAAGATCAACCCGAGGACAAGAGCCGTTTTGGCCGGTCTGGGAGTT	180
<i>B.dothidea</i> .27-I	AGCGACGGTCGTGCGAAGATCAACCCGAGGACAAGAGCCGTTTTGGCCGGTCTGGGAGTT	180

<i>B.corticis</i> .2-I	TACCAGGACGGCATTGCCAAACAGCAAGTCAACGGCAAGGAGGTGACGGCACATATTTAC	240
<i>B.corticis</i> .30-I	TACCAGGACGGCATTGCCAAACAGCAAGTCAACGGCAAGGAGGTGACGGCACATATTTAC	240
<i>B.dothidea</i> .30-I	TACCAGGACGGCATTGCCAAACAGCAAGTCAACGGCAAGGAGGTGACGGCACATATTTAC	240
<i>B.dothidea</i> .28-I	TACCAGGACGGCATTGCCAAACAGCAAGTCAACGGCAAGGAGGTGACGGCACATATTTAC	240
<i>B.dothidea</i> .6-I	TACCAGGACGGCATTGCCAAACAGCAAGTCAACGGCAAGGAGGTGACGGCACATATTTAC	240
<i>B.dothidea</i> .27-I	TACCAGGACGGCATTGCCAAACAGCAAGTCAACGGCAAGGAGGTGACGGCACATATTTAC	240

<i>B.corticis</i> .2-I	GAGTACACCTCCCAAATGAGCCTGGAAATCAAGAAGGGTGTCGTGAACATCAAGAAGGGC	300
<i>B.corticis</i> .30-I	GAGTACACCTCCCAAATGAGCCTGGAAATCAAGAAGGGTGTCGTGAACATCAAGAAGGGC	300
<i>B.dothidea</i> .30-I	GAGTACACCTCCCAAATGAGCCTGGAAATCAAGAAGGGTGTCGTGAACATCAAGAAGGGC	300
<i>B.dothidea</i> .28-I	GAGTACACCTCCCAAATGAGCCTGGAAATCAAGAAGGGTGTCGTGAACATCAAGAAGGGC	300
<i>B.dothidea</i> .6-I	GAGTACACCTCCCAAATGAGCCTGGAAATCAAGAAGGGTGTCGTGAACATCAAGAAGGGC	300
<i>B.dothidea</i> .27-I	GAGTACACCTCCCAAATGAGCCTGGAAATCAAGAAGGGTGTCGTGAACATCAAGAAGGGC	300

Clonagem e caracterização de genes de sintetase da quitina em *Botryosphaeria* spp.

B.corticis.2-I ACCACTCCCATTTCAGATGTTGTTCTGTTTGAAGGAAAAGAACAGAGAAGATCAACTCG 360
B.corticis.30-I ACCACTCCCATTTCAGATGTTGTTCTGTTTGAAGGAAAAGAACAGAGAAGATCAACTCG 360
B.dothisidea.30-I ACCACTCCCATTTCAGATGTTGTTCTGTTTGAAGGAAAAGAACAGAGAAGATCAACTCG 360
B.dothisidea.28-I ACCACTCCCATTTCAGATGTTGTTCTGTTTGAAGGAAAAGAACAGAGAAGATCAACTCG 360
B.dothisidea.6-I ACCACTCCCATTTCAGATGTTGTTCTGTTTGAAGGAAAAGAACAGAGAAGATCAACTCG 360
B.dothisidea.27-I ACCACTCCCATTTCAGATGTTGTTCTGTTTGAAGGAAAAGAACAGAGAAGATCAACTCG 360
***** ** *****

B.corticis.2-I CACAGATGGTTTTTCCAGGCTTTTGGCAGCGTTCTCGACCCCAACATTTGCGTCCTCATC 420
B.corticis.30-I CACAGATGGTTTTTCCAGGCTTTTGGCAGCGTTCTCGACCCCAACATTTGCGTCCTCATC 420
B.dothisidea.30-I CACAGATGGTTTTTCCAGGCTTTTGGCAGCGTTCTCGACCCCAACATTTGCGTCCTCATC 420
B.dothisidea.28-I CACAGATGGTTTTTCCAGGCTTTTGGCAGCGTTCTCGACCCCAACATTTGCGTCCTCATC 420
B.dothisidea.6-I CACAGATGGTTTTTCCAGGCTTTTGGCAGCGTTCTCGACCCCAACATTTGCGTCCTCATC 420
B.dothisidea.27-I CACAGATGGTTTTTCCAGGCTTTTGGCAGCGTTCTCGACCCCAACATTTGCGTCCTCATC 420

B.corticis.2-I GATGCCGGTACGAAACCCGGAAGGACTCGATTTACCAACTCTGGAAGGCATTTCGACCTG 480
B.corticis.30-I GATGCCGGTACGAAACCCGGAAGGACTCGATTTACCAACTCTGGAAGGCATTTCGACCTG 480
B.dothisidea.30-I GATGCCGGTACGAAACCCGGAAGGACTCGATTTACCAACTCTGGAAGGCATTTCGACCTG 480
B.dothisidea.28-I GATGCCGGTACGAAACCCGGAAGGACTCGATTTACCAACTCTGGAAGGCATTTCGACCTG 480
B.dothisidea.6-I GATGCCGGTACGAAACCCGGAAGGACTCGATTTACCAACTCTGGAAGGCATTTCGACCTG 480
B.dothisidea.27-I GATGCCGGTACGAAACCCGGAAGGACTCGATTTACCAACTCTGGAAGGCATTTCGACCTG 480

B.corticis.2-I GAGCCAATGTGCGCCGGCGCTTGTGGTGAGATCAAGGCTATGTTGGTCCACGGCAAGAAG 540
B.corticis.30-I GAGCCAATGTGCGCCGGCGCTTGTGGTGAGATCAAGGCTATGTTGGTCCACGGCAAGAAG 540
B.dothisidea.30-I GAGCCAATGTGCGCCGGCGCTTGTGGTGAGATCAAGGCTATGTTGGTCCACGGCAAGAAG 540
B.dothisidea.28-I GAGCCAATGTGCGCCGGCGCTTGTGGTGAGATCAAGGCTATGTTGGTCCACGGCAAGAAG 540
B.dothisidea.6-I GAGCCAATGTGCGCCGGCGCTTGTGGTGAGATCAAGGCTATGTTGGTCCACGGCAAGAAG 540
B.dothisidea.27-I GAGCCAATGTGCGCCGGCGCTTGTGGTGAGATCAAGGCTATGTTGGTCCACGGCAAGAAG 540

B.corticis.2-I CTGCTCAACCCCTTGTTCGCGACC 564
B.corticis.30-I CTGCTCAACCCCTTGTTCGCGACC 564
B.dothisidea.30-I CTGCTCAACCCCTTGTTCGCGACC 564
B.dothisidea.28-I CTGCTCAACCCCTTGTTCGCGACC 564
B.dothisidea.6-I CTGCTCAACCCCTTGTTCGCGACC 564
B.dothisidea.27-I CTGCTCAACCCCTTGTTCGCGACC 564
***** **

Classe II

B.corticis.10-II GAGATCGACTTCACTCGCACCATGCACGCGTCATGCGGAATATTTTCGCACCTCTGCTCC 60
B.corticis.18-II GAGATCGACTTCACTCGCACCATGCACGCGTCATGCGGAATATTTTCGCACCTCTGCTCC 60
B.corticis.11-II GAGATCGACTTCACTCGCACCATGCACGCGTCATGCGGAATATTTTCGCACCTCTGCTCC 60
B.dothisidea.9-II GAGATCGACTTCACTCGCACCATGCACGCGTCATGCGGAATATTTTCGCACCTCTGCTCC 60
B.dothisidea.32-II GAGATCGACTTCACTCGCACCATGCACGCGTCATGCGGAATATTTTCGCACCTCTGCTCC 60

B.corticis.10-II CGCGCCAAAAGCAGGACTTGGGGAAAAGATGGATGGCAAAAAATTGTGGTCTGCATCATC 120
B.corticis.18-II CGCGCCAAAAGCAGGACTTGGGGAAAAGATGGATGGCAAAAAATTGTGGTCTGCATCATC 120
B.corticis.11-II CGCGCCAAAAGCAGGACTTGGGGAAAAGATGGATGGCAAAAAATTGTGGTCTGCATCATC 120
B.dothisidea.9-II CGCGCTAAAAGCAGGACATGGGGAAAAGATGGATGGCAAAAAATTGTGGTCTGCATCATC 120
B.dothisidea.32-II CGCGCTAAAAGCAGGACATGGGGAAAAGATGGATGGCAAAAAATTGTGGTCTGCATCATC 120

B.CORTICIS.10-II GCTGATGGGCGAACAAGGTTTCATCCTCGCGTGCTCGACGCGTTGGCTGCCATGGGTTGC 180
B.CORTICIS.18-II GCTGATGGGCGAACAAGGTTTCATCCTCGCGTGCTCGACGCGTTGGCTGCCATGGGTTGC 180
B.CORTICIS.11-II GCTGATGGGCGAACAAGGTTTCATCCTCGCGTGCTCGACGCGTTGGCTGCCATGGGTTGC 180
B.DOTHIDEA.9-II GCTGATGGTGGGACAAAGGTTTCATCCTCGCGTGCTCGACGCGTTGGCTGCCATGGGTTGC 180
B.DOTHIDEA.32-II GCTGATGGTGGGACAAAGGTTTCATCCTCGCGTGCTCGACGCGTTGGCTGCCATGGGTTGC 180
***** **

B.corticis.10-II TACCAAGAGGGCATCGCCAAGAACACGGTCAACGAAAAGGAGGTACCCGCGCACGTCTAC 240
B.corticis.18-II TACCAAGAGGGCATCGCCAAGAACACGGTCAACGAAAAGGAGGTACCCGCGCACGTCTAC 240
B.corticis.11-II TACCAAGAGGGCATCGCCAAGAACACGGTCAACGAAAAGGAGGTACCCGCGCACGTCTAC 240
B.dothisidea.9-II TACCAAGAGGGCATCGCCAAGAACACGGTCAACGAAAAGGAGGTACCCGCGCACGTCTAC 240
B.dothisidea.32-II TACCAAGAGGGCATCGCCAAGAACACGGTCAACGAAAAGGAGGTACCCGCGCACGTCTAC 240

<i>B.corticis</i> .10-II	GAATACACCACTCAGGTCTCGCTTGACTCGGGCCTCAGATTCAAGGGCGCAGAGAAGGGA	300
<i>B.corticis</i> .18-II	GAATACACCACTCAGGTCTCGCTTGACTCGGACCTCAGATTCAAGGGCGCAGAGAAGGGA	300
<i>B.corticis</i> .11-II	GAATACACCACTCAGGTCTCGCTTGACTCGGACCTCAGATTCAAGGGCGCAGAAAAGGGA	300
<i>B.dothisidea</i> .9-II	GAATACACCACTCAGGTCTCGCTTGACTCGGATCTCAGATTCAAGGGCGCAGAGAAGGGA	300
<i>B.dothisidea</i> .32-II	GAATACACCACTCAGGTCTCGCTTGACTCGGATCTCAGATTCAAGGGCGCAGAGAAGGGA	300

<i>B.corticis</i> .10-II	ATTGTTCCCTTGCCAGATCATCTTCTGTCTGAAGGAAAAGAACCAGAAGAAGCTGAACTCG	360
<i>B.corticis</i> .18-II	ATTGTTCCCTTGCCAGATCATCTTCTGTCTGAAGGAAAAGAACCAGAAGAAGCTGAACTCG	360
<i>B.corticis</i> .11-II	ATTGTTCCCTTGCCAGATCATCTTCTGTCTGAAGGAAAAGAACCAGAAGAAGCTGAACTCG	360
<i>B.dothisidea</i> .9-II	ATTGTTCCCTTGCCAGATCATCTTCTGTCTGAAGGAAAAGAACCAGAAGGAGCTGAACTCG	360
<i>B.dothisidea</i> .32-II	ATTGTTCCCTTGCCAGATCATCTTCTGTCTGAAGGAAAAGAACCAGAAGAAGCTGAACTCG	360

<i>B.corticis</i> .10-II	CACAGATGGTTCCTTAATGCCTTTGGGCGCGCCTTGAACCCTAACATTTGCATTCTTCTG	420
<i>B.corticis</i> .18-II	CACAGATGGTTCCTTAATGCCTTTGGGCGCGCCTTGAACCCTAACATTTGCATTCTTCTG	420
<i>B.corticis</i> .11-II	CACAGATGGTTCCTTAATGCCTTTGGGCGCGCCTTGAACCCTAACATTTGCATTCTTCTG	420
<i>B.dothisidea</i> .9-II	CACAGATGGTTTTTAAATGCCTTTGGGCGCGCCTTGAACCCTAACATTTGCATTCTTCTG	420
<i>B.dothisidea</i> .32-II	CACAGATGGTTTTTAAATGCCTTTGGGCGCGCCTTGAACCCTAACATTTGCATTCTTCTG	420

<i>B.corticis</i> .10-II	GACGTTGGTACCAAGCCTGGTTCCAAAGCCCTCTACTACCTTTGGAAGGCTTTTCGACACG	480
<i>B.corticis</i> .18-II	GACGTTGGTACCAAGCCTGGTTCCAAAGCTCTCTACTACCTTTGGAAGGCTTTTCGACACG	480
<i>B.corticis</i> .11-II	GACGTTGGTACCAAGCCTGGTTCCAAAGCCCTCTACTACCTTTGGAAGGCTTTTCGACACG	480
<i>B.dothisidea</i> .9-II	GACGTTGGTACCAAGCCTGGTTCCAAAGCCCTCTACTACCTTTGGAAGGCTTTTCGACACG	480
<i>B.dothisidea</i> .32-II	GACGTTGGTACCAAGCCTGGTTCCAAAGCCCTCTACTACCTTTGGAAGGCTTTTCGACACG	480

<i>B.corticis</i> .10-II	GACTCCAGCGTTGCTGGTGCGGCTGGTGAAATCAAAGCTGGCAAGGGCAAGGGATGGCTC	540
<i>B.corticis</i> .18-II	GACTCCAGCGTTGCTGGTGCGGCTGGTGAAATCAAAGCTGGCAAGGGCAAGGGATGGCTC	540
<i>B.corticis</i> .11-II	GACTCCAGCGTTGCTGGTGCGGCTGGTGAAATCAAAGCTGGCAAGGGCAAGGGATGGCTC	540
<i>B.dothisidea</i> .9-II	GACTCCAGCGTTGCTGGTGCGGCTGGTGAAATCAAAGCTGGCAAGGGCAAGGGATGGCTC	540
<i>B.dothisidea</i> .32-II	GACTCCAGCGTTGCTGGTGCGGCTGGTGAAATCAAAGCTGGCAAGGGCAAGGGATGGCTC	540

<i>B.corticis</i> .10-II	GGTCTCCTGAACCCCTTGTTGCTTCT	567
<i>B.corticis</i> .18-II	GGTCTCCTGAACCCCTTGTTGCTTCT	567
<i>B.corticis</i> .11-II	GGTTCTCCTGAACCCCTTGTTGCTTCT	567
<i>B.dothisidea</i> .9-II	GGTCTCCTGAACCCCTTGTTGCTTCT	567
<i>B.dothisidea</i> .32-II	GGTCTCCTGAACCCCTTGTTGCTTCT	567
*** *****		

Classe III

<i>B.dothisidea</i> .1-III	AAGGTTCTGACGGCCAGAACGCTTCACGGTGTTATGCAGAACATCCGCGATATTGTCAAC	60
<i>B.dothisidea</i> .4-III	AAGGTTCTGACGGCCAGAACGCTTCACGGTGTTATGCAGAACATCCGCGATATTGTCAAC	60
<i>B.dothisidea</i> .17-III	AAGGTTCTGACGGCCAGAACGCTTCACGGTGTTATGCAGAACATCCGCGATATTGTCAAC	60
<i>B.dothisidea</i> .29-III	AAGGTTCTGACGGCCAGAACGCTTCACGGTGTTATGCAGAACATCCGCGATATTGTCAAC	60
<i>B.dothisidea</i> .31-III	AAGGTTCTGACGGCCAGAACGCTTCACGGTGTTATGCAGAACATCCGCGATATTGTCAAC	60
<i>B.corticis</i> .5-III	AAGGTTCTGACGTCCAGAACGCTTCACGGTGTTATGCAGAACATCCGCGATATTGTCAAC	60
<i>B.corticis</i> .25-III	AAGGTTCTGACGTCCAGAACGCTTCACGGTGTTATGCAGAACATCCGCGATATTGTCAAC	60

<i>B.dothisidea</i> .1-III	CTGAAGAAGTCCGAGTTCTGGAACAAGGGTGGTCCGGCCTGGCAAAAGATTGTCGTGTGC	120
<i>B.dothisidea</i> .4-III	CTGAAGAAGTCCGAGTTCTGGAACAAGGGTGGTCCAGCCTGGCAAAAGATTGTCGTGTGC	120
<i>B.dothisidea</i> .17-III	CTGAAGAAGTCCGAGTTCTGGAACAAGGGTGGTCCGGCCTGGCAAAAGATTGTCGTGTGC	120
<i>B.dothisidea</i> .29-III	CTGAAGAAGTCCGAGTTCTGGAACAAGGGTGGTCCGGCCTGGCAAAAGATTGTCGTGTGC	120
<i>B.dothisidea</i> .31-III	CTGAAGAAGTCCGAGTTCTGGAACAAGGGTGGTCCGGCCTGGCAAAAGATTGTCGTGTGC	120
<i>B.corticis</i> .5-III	CTGAAGAAGTCCGAGTTCTGGAACAAGGGTGGTCCGGCCTGGCAAAAGATTGTCGTGTGC	120
<i>B.corticis</i> .25-III	CTGAAGAAGTCCGAGTTCTGGAACAAGGGTGGTCCGGCCTGGCAAAAGATTGTCGTGTGC	120

<i>B.dothisidea</i> .1-III	TTGGTCTTCGACGGTATCGACCCTGCGACAAGGGCACGCTCGACGTCCTCGCCACCATT	180
<i>B.dothisidea</i> .4-III	TTGGTCTTCGACGGTATCGACCCTGCGACAAGGGCACGCTCGACGTCCTCGCCACCATT	180
<i>B.dothisidea</i> .17-III	TTGGTCTTCGACGGTATCGACCCTGCGACAAGGGCACGCTCGACGTCCTCGCCACCATT	180
<i>B.dothisidea</i> .29-III	TTGGTCTTCGACGGTATCGACCCTGCGACAAGGGCACGCTCGACGTCCTCGCCACCATT	180
<i>B.dothisidea</i> .31-III	TTGGTCTTCGACGGTATCGACCCTGCGACAAGGGCACGCTCGACGTCCTCGCCACCATT	180
<i>B.corticis</i> .5-III	TTGGTCTTCGACGGTATCGACCCTGCGACAAGGGCACGCTCGACGTCCTCGCCACCATT	180
<i>B.corticis</i> .25-III	TTGGTCTTCGACGGTATCGACCCTGCGACAAGGGCACGCTCGACGTCCTCGCCACCATT	180

Clonagem e caracterização de genes de sintetase da quitina em *Botryosphaeria* spp.

B.dothidea.1-III GGTATCTACCAGGACGGTGTCTATGAAGAGGGATATCGACGGCAAGGAGACGACTGCGCAC 240
B.dothidea.4-III GGTATCTACCAGGACGGTGTCTATGAAGAGGGATATCGACGGCAAGGAGACGACTGCGCAC 240
B.dothidea.17-III GGTATCTACCAGGACGGTGTCTATGAAGAGGGATATCGACGGCAAGGAGACGACTGCGCAC 240
B.dothidea.29-III GGTATCTACCAGGACGGTGTCTATGAAGAGGGATATCGACGGCAAGGAGACGACTGCGCAC 240
B.dothidea.31-III GGTATCTACCAGGACGGTGTCTATGAAGAGGGATATCGACGGCAAGGAGACGACTGCGCAC 240
B.corticis.5-III GGTATCTACCAGGACGGTGTCTATGAAGAGGGATATCGACGGCAAGGAGACTACTGCGCAC 240
B.corticis.25-III GGTATCTACCAGGACGGTGTCTATGAAGAGGGATATCGACGGCAAGGAGACTACTGCGCAC 240

B.dothidea.1-III ATTGTAAGCTGAAGCGACGCCCGCCAAAAGTTTCGGTTGCTAACACTCCTGAAGTTCGAAT 300
B.dothidea.4-III ATCGTAAGCTGAAGCGACGCCCGCCAAAAGTTTCGGTTGCTAACACTCCTGAAGTTCGAAT 300
B.dothidea.17-III ATTGTAAGCTGAAGCGACGCCCGCCAAAAGTTTCGGTTGCTAACACTCCTGAAGTTCGAAT 300
B.dothidea.29-III ATTGTAAGCTGAAGCGACGCCCGCCAAAAGTTTCGGTTGCTAACACTCCTGAAGTTCGAAT 300
B.dothidea.31-III ATTGTAAGCTGAAGCGACGCCCGCCAAAAGTTTCGGTTGCTAACACTCCTGAAGTTCGAAT 300
B.corticis.5-III ATTGTAAGCTGAAGCGACGCCCGCTAAAAGTTTCGGTTGCTAACACTCCTGAAGTTCGAAT 300
B.corticis.25-III ATTGTAAGCTGAAGCGACGCCCGCTAAAAGTTTCGGTTGCTAACACTCCTGAAGTTCGAAT 300
** *****

B.dothidea.1-III ACACGACCCAGCTGTCTGTTACCCCCAACAGCAGCTGATCCGCCCGCAGCATGACAGCT 360
B.dothidea.4-III ACACGACCCAGCTGTCTGTTACCCCCAACAGCAGCTGATCCGCCCGCAGCATGACAGCT 360
B.dothidea.17-III ACACGACCCAGCTGTCTGTTACCCCCAACAGCAGCTGATCCGCCCGCAGCATGACAGCT 360
B.dothidea.29-III ACACGACCCAGCTGTCTGTTACCCCCAACAGCAGCTGATCCGCCCGCAGCATGACAGCT 360
B.dothidea.31-III ACACGACCCAGCTGTCTGTTACCCCCAACAGCAGCTGATCCGCCCGCAGCATGACAGCT 360
B.corticis.5-III ACACGACCCAGCTGTCTGTTACCCCCAACAGCAGCTGATCCGCCCGCAGCATGACAGCT 360
B.corticis.25-III ACACGACCCAGCTGTCTGTTACCCCCAACAGCAGCTGATCCGCCCGCAGCATGACAGCT 360

B.dothidea.1-III CCAGCACCCCTGCCCCGGTGCAGATGATGTACTGTCTGAAGCAGAAGAACACCAAGAAGA 420
B.dothidea.4-III CCAGCACCCCTGCCCCGGTGCAGATGATGTCTGTCTGAAGCAGAAGAACACCAAGAAGA 420
B.dothidea.17-III CCAGCACCCCTGCCCCGGTGCAGATGATGTCTGTCTGAAGCAGAAGAACACCAAGAAGA 420
B.dothidea.29-III CCAGCACCCCTGCCCCGGTGCAGATGATGTCTGTCTGAAGCAGAAGAACACCAAGAAGA 420
B.dothidea.31-III CCAGCACCCCTGCCCCGGTGCAGATGATGTCTGTCTGAAGCAGAAGAACACCAAGAAGA 420
B.corticis.5-III CCAGCACTCTGCCCCGGTGCAGATGATGTCTGTCTGAAGCAGAAGAACACCAAGAAGA 420
B.corticis.25-III CCAGCACTCTGCCCCGGTGCAGATGATGTCTGTCTGAAGCAGAAGAACACCAAGAAGA 420

B.dothidea.1-III TCAACTCTCACCCTTGGCTCTTTACTGCTTTCGGCAGAATCCTCAACCTGAAGTTGTTA 480
B.dothidea.4-III TCAACTCTCACCCTTGGCTCTTTACTGCTTTCGGCAGAATCCTCAACCTGAAGTTGTTA 480
B.dothidea.17-III TCAACTCTCACCCTTGGCTCTTTACTGCTTTCGGTAGAATCCTCAACCTGAAGTTGTTA 480
B.dothidea.29-III TCAACTCTCACCCTTGGCTCTTTACTGCTTTCGGCAGAATCCTCAACCTGAAGTTGTTA 480
B.dothidea.31-III TCAACTCTCACCCTTGGCTCTTTACTGCTTTCGGCAGAATCCTCAACCTGAAGTTGTTA 480
B.corticis.5-III TCAACTCTCACCCTTGGCTCTTTACTGCTTTCGGCAGAATCCTCAACCTGAAGTTGTTA 480
B.corticis.25-III TCAACTCTCACCCTTGGCTCTTTACTGCTTTCGGCAGAATCCTCAACCTGAAGTTGTTA 480

B.dothidea.1-III TTCTGATTGATGCCGTTACCAAGCCCGGCCCAAGTCCCTGCTCGCGCTTTGGGAGGCTT 540
B.dothidea.4-III TTCCGATTGATGCCGTTACCAAGCCCGGCCCAAGTCCCTGCTCGCGCTTTGGGAGGCTT 540
B.dothidea.17-III TTCTGATTGATGCCGTTACCAAGCCCGGCCCAAGTCCCTGCTCGCGCTTTGGGAGGCTT 540
B.dothidea.29-III TTCTGATTGATGCCGTTACCAAGCCCGGCCCAAGTCCCTGCTCGCGCTTTGGGAGGCTT 540
B.dothidea.31-III TTCTGATTGATGCCGTTACCAAGCCCGGCCCAAGTCCCTGCTCGCGCTTTGGGAGGCTT 540
B.corticis.5-III TTCTGATTGATGCCGTTACCAAGCCCGGCCCAAGTCCCTGCTCGCGCTTTGGGAGGCTT 540
B.corticis.25-III TTCTGATTGATGCCGTTACCAAGCCCGGCCCAAGTCCCTGCTCGCGCTTTGGGAGGCTT 540
*** *****

B.dothidea.1-III TCTACAACGACAAGGATCTCGGTGGTGCCTGTGGTGAAATTCACGCCATGTTGGGCAAGG 600
B.dothidea.4-III TCTACAACGACAAGGATCTCGGTGGTGCCTGTGGTGAAATTCACGCCATGTTGGGCAAGG 600
B.dothidea.17-III TCTACAACGACAAGGATCTCGGTGGTGCCTGTGGTGAAATTCACGCCATGTTGGGCAAGG 600
B.dothidea.29-III TCTACAACGACAAGGATCTCGGTGGTGCCTGTGGTGAAATTCACGCCATGTTGGGCAAGG 600
B.dothidea.31-III TCTACAACGACAAGGATCTCGGTGGTGCCTGTGGTGAAATTCACGCCATGTTGGGCAAGG 600
B.corticis.5-III TCTACAACGACAAGGATCTCGGTGGTGCCTGTGGTGAAATTCACGCCATGTTGGGCAAGG 600
B.corticis.25-III TCTACAACGACAAGGATCTCGGTGGTGCCTGTGGTGAAATTCACGCCATGTTGGGCAAGG 600

```

B.dothisidea.1-III      GCTGGAAGAACCTCGTCAACCCCTCATCGCCGCT 635
B.dothisidea.4-III      GCTGGAAGAACCTCGTCAACCCCTCATCGCCGCT 635
B.dothisidea.17-III     GCTGGAAGAACCTCGTCAACCCCTCATCGCCGCT 635
B.dothisidea.29-III     GCTGGAAGAACCTCGTCAACCCCTCATCGCCGCT 635
B.dothisidea.31-III     GCTGGAAGAACCTCGTCAACCCCTCATCGCCGCT 635
B.corticis.5-III        GCTGGAAGAACCTCGTCAACCCCTCATCGCCGCT 635
B.corticis.25-III       GCTGGAAGATCTCGTCAACCCCTCATCGCCGCT 635
***** * *****

```

Figura 15. Alinhamento das sequências nucleotídicas dos fragmentos do gene de sintetase da quitina das duas estirpes de *Botryosphaeria*. Um asterisco indica completa identidade naquela posição, em todos os fragmentos. As regiões em realce correspondem as sequências dos intrões.

Classe I

```

B.dothisidea.27-I      DELFARNLTGVIKNIEYMNSRMNSKTWGKDAWKKIVVCVSDGRAKINPRTRAVLAGLV 60
B.dothisidea.6-I       DELFARTLTGVIKNIEYMNSRTNSKTWGKDAWKKIVVCVSDGRAKINPRTRAVLAGLV 60
B.corticis.30-I        DELFARTLTGVIKNIEYMNSRTNSKTWGKDAWKKIVVCVSDGRAKINPRTRAVLAGLV 60
B.corticis.2-I         DELFARTLTGVIKNIEYMNSRTNSKTWGKDAWKKIVVCVSDGRAKINPRTRAVLAGLV 60
B.dothisidea.28-I      DELFARTLTGVIKNIEYMNSRTNSKTWGKDAWKKIVVCVSDGRAKINPRTRAVLAGLV 60
B.dothisidea.30-I      DELFARTLTGVIKNIEYMNSRTNSKTWGKDAWKKIVVCVSDGRAKINPRTRAVLAGLV 60
*****
B.dothisidea.27-I      YQDGIKQQVNGKEVTAHIYEYTSQMSLEIKKGVVNIKKGTTPIQMPFCLKEKNQKKINS 120
B.dothisidea.6-I       YQDGIKQQVNGKEVTAHIYEYTSQMSLEIKKGVVNIKKGTTPIQMLFCLKEKNQKKINS 120
B.corticis.30-I        YQDGIKQQVNGKEVTAHIYEYTSQMSLEIKKGVVNIKKGTTPIQMLFCLKEKNQKKINS 120
B.corticis.2-I         YQDGIKQQVNGKEVTAHIYEYTSQMSLEIKKGVVNIKKGTTPIQMLFCLKEKNQKKINS 120
B.dothisidea.28-I      YQDGIKQQVNGKEVTAHIYEYTSQMSLEIKKGVVNIKKGTTPIQVLFCLKEKNQKKINS 120
B.dothisidea.30-I      YQNGIAKQQVNGKEVTAHIYEYTSQMSLEIKKGVVNIKKGTTPIQMLFCLKEKNQKKINS 120
**:*
B.dothisidea.27-I      HRWFFQAFGSVLDPNICVLIDAGTKPGKDSIYQLWKAFLDLEPMCAGACGEIKAMLVHGKK 180
B.dothisidea.6-I       HRWFFQAFGSVLDPNICVLIDAGTKPGKDSIYQLWKAFLDLEPMCAGACGEIKAMLVHGKK 180
B.corticis.30-I        HRWFFQAFGSVLDPNICVLIDAGTKPGKDSIYQLWKAFLDLEPMCAGACGEIKAMLVHGKK 180
B.corticis.2-I         HRWFFQAFGSVLDPNICVLIDAGTKPGKDSIYQLWKAFLDLEPMCAGACGEIKAMLVHGKK 180
B.dothisidea.28-I      HRWFFQAFGSVLDPNICVLIDAGTKPGKDSIYQLWKAFLDLEPMCAGACGEIKAMLVHGKK 180
B.dothisidea.30-I      HRWFFQAFGSVLDPNICVLIDAGTKPGKDSIYQLWKAFLDLEPMCAGACGEIKAMLVHGKK 180
*****
B.dothisidea.27-I      LLNPLVAT 188
B.dothisidea.6-I       LLNPLVAT 188
B.corticis.30-I        LLNPLVAT 188
B.corticis.2-I         LLNPLVAT 188
B.dothisidea.28-I      LLNPLVAA 188
B.dothisidea.30-I      LLDPLLR- 187
**:*

```

Classe II

```

B.dothisidea.9-II      EIDFTRTMHGVMRNISHFCSRAKSRTWGKDGWQKIVVCIADGRTKVHPRVLDALAAMGC 60
B.dothisidea.32-II     EIDFTRTMHGVMRNISHFCSRAKSRTWGKDGWQKIVVCIADGRTKVHPRVLDALAAMGC 60
B.corticis.11-II       EIDFTRTMHGVMRNISHFCSRAKSRTWGKDGWQKIVVCIADGRTKVHPRVLDALAAMGC 60
B.corticis.18-II       EIDFTRTMHGVMRNISHFCSRAKSRTWGKDGWQKIVVCIADGRTKVHPRVLDALAAMGC 60
B.corticis.10-II       EIDFTRTMHGVMRNISHLCSRAKSRTWGKDGWQKIVVCIADGRTKVHPRVLDALAAMGC 60
*****
B.dothisidea.9-II      YQEGIAKNTVNEKEVTAHVYEYTTQVSLDSDLRFKGAEGIVPCQIIFCLKEKNQKELNS 120
B.dothisidea.32-II     YQEGIAKNTVNEKEVTAHVYEYTTQVSLDSDLRFKGAEGIVPCQIIFCLKEKNQKELNS 120
B.corticis.11-II       YQEGIAKNTVNEKEVTAHVYEYTTQVSLDSDLRFKGAEGIVPCQIIFCLKEENQKELNS 120
B.corticis.18-II       YQEGIAKNTVNEKEVTAHVYEYTTQVSLDSDLRFKGAEGIVPCQIIFCLKEKNQKELNS 120
B.corticis.10-II       YQEGIAKNTVNEKEVTAHVYEYTTQVSLDSDLRFKGAEGIVPCQIIFCLKEKNQKELNS 120
*****

```

<i>B.dothidea</i> .9-II	HRWFFNAFGRALNPNICILLDVGTKPGSKALYYLWKAFDTSVAGAAAGEIKAGKKGWL 180
<i>B.dothidea</i> .32-II	HRWFFNAFGRALNPNICILLDVGTKPGSKALYYLWKAFDTSVAGAAAGEIKAGKKGWL 180
<i>B.corticis</i> .11-II	HRWFFNAFGRALNPNICILLDVGTKPGSKALYYLWKAFDTSVAGAAAGEIKAGKKGWL 180
<i>B.corticis</i> .18-II	HRWFFNAFGRALNPNICILLDVGTKPGSKALYYLWKAFDTSVAGAAAGEIKAGKKGWL 180
<i>B.corticis</i> .10-II	HRWFFNAFGRALNPNICILLDVGTKPGSKALYYLWKAFDTSVAGAAAGEIKAGKKGWL 180

<i>B.dothidea</i> .9-II	GLLNPLVAS 189
<i>B.dothidea</i> .32-II	GLLNPLVAS 189
<i>B.corticis</i> .11-II	GFLNPLVAS 189
<i>B.corticis</i> .18-II	GLLNPLVAS 189
<i>B.corticis</i> .10-II	GLLNPLVAS 189
	*:*****
Classe III	
<i>B.dothidea</i> .1-III	KVLTARTLHGVMQNIRDIVNLKKSEFWNKGPPAWQKIVVCLVFDGIDPCDKGTLVDLATI 60
<i>B.dothidea</i> .17-III	KVLTARTLHGVMQNIRDIVNLKKSEFWNKGPPAWQKIVVCLVFDGIDPCDKGTLVDLATI 60
<i>B.dothidea</i> .4-III	KVLTARTLHGVMQNIRDIVNLKKSEFWNKGPPAWQKIVVCLVFDGIDPCDKGTLVDLATI 60
<i>B.dothidea</i> .29-III	KVLTARTLHGVMQNIRDIVNLKKSEFWNKGPPAWQKIVVCLVFDGIDPCDKGTLVDLATI 60
<i>B.dothidea</i> .31-III	KVLTARTLHGVMQNIRDIVNLKKSEFWNKGPPAWQKIVVCLVFDGIDPCDKGTLVDLATI 60
<i>B.corticis</i> .25-III	KVLTARTLHGVMQNIRDIVNLKKSEFWNKGPPAWQKIVVCLVFDGIDPCDKGTLVDLATI 60
<i>B.corticis</i> .5-III	KVLTARTLHGVMQNIRDIVNLKKSEFWNKGPPAWQKIVVCLVFDGIDPCDKGTLVDLATI 60
	****:***** **:
<i>B.dothidea</i> .1-III	GIYQDGVMKRDIDGKETTAFHIFEYTTQLSVTPNQQLIRPHDDSSSTLPPVQMMFCLKQKN 120
<i>B.dothidea</i> .17-III	GIYQDGVMKRDIDGKETTAFHIFEYTTQLSVTPNQQLIRPHDDSSSTLPPVQMMFCLKQKN 120
<i>B.dothidea</i> .4-III	GIYQDGVMKRDIDGKETTAFHIFEYTTQLSVTPNQQLIRPHDDSSSTLPPVQMMFCLKQKN 120
<i>B.dothidea</i> .29-III	GIYQDGVMKRDIDGKETTAFHIFEYTTQLSVTPNQQLIRPHDDSSSTLPPVQMMFCLKQKN 120
<i>B.dothidea</i> .31-III	GIYQDGVMKRDIDGKETTAFHIFEYTTQLSVTPNQQLIRPHDDSSSTLPPVQMMFCLKQKN 120
<i>B.corticis</i> .25-III	GIYQDGVMKRDIDGKETTAFHIFEYTTQLSVTPNQQLIRPHDDSSSTLPPVQMMFCLKQKN 120
<i>B.corticis</i> .5-III	GIYQDGVMKRDIDGKETTAFHIFEYTTQLSVTPNQQLIRPHDDSSSTLPPVQMMFCLKQKN 120
	*****:*****
<i>B.dothidea</i> .1-III	TKKINSHRWLFTAFGRILNPEVVILIDAGTKPGPKSLALWEAFYNDKDLGGACGEIHAM 180
<i>B.dothidea</i> .17-III	TKKINSHRWLFTAFGRILNPEVVILIDAGTKPGPKSLALWEAFYNDKDLGGACGEIHAM 180
<i>B.dothidea</i> .4-III	TKKINSHRWLFTAFGRILNPEVVILIDAGTKPGPKSLALWEAFYNDKDLGGACGEIHAM 180
<i>B.dothidea</i> .29-III	TKKINSHRWLFTAFGRILNPEVVILIDAGTKPGPKSLALWEAFYNDKDLGGACGEIHAM 180
<i>B.dothidea</i> .31-III	TKKINSHRWLFTAFGRILNPEVVILIDAGTKPGPKSLALWEAFYNDKDLGGACGEIHAM 180
<i>B.corticis</i> .25-III	TKKINSHRWLFTAFGRILNPEVVILIDAGTKPGPKSLALWEAFYNDKDLGGACGEIHAM 180
<i>B.corticis</i> .5-III	TKKINSHRWLFTAFGRILNPEVVILIDAGTKPGPKSLALWEAFYNDKDLGGACGEIHAM 180
	*****:*****
<i>B.dothidea</i> .1-III	LGKGWKNLVNPLIAA 195
<i>B.dothidea</i> .17-III	LGKGWKNLVNPLIAA 195
<i>B.dothidea</i> .4-III	LGKGWKNLVNPLIAA 195
<i>B.dothidea</i> .29-III	LGKGWKNLVNPLIAA 195
<i>B.dothidea</i> .31-III	LGKGWKNLVNPLIAA 195
<i>B.corticis</i> .25-III	LGKGWKNLVNPLIAA 195
<i>B.corticis</i> .5-III	LGKGWKNLVNPLIAA 195
	*****:*****

Figura 16. Alinhamento das sequências de a.a. deduzidas dos fragmentos do gene de sintetase da quitina das duas estirpes de *Botryosphaeria*. Um asterisco indica identidade completa naquela posição em todos os fragmentos. Dois pontos indicam substituições conservativas e um ponto indica substituições semi-conservativas.

3.7 Análise filogenética

De forma a avaliar o potencial dos genes de CHS para estabelecer relações filogenéticas entre espécies de *Botryosphaeria*, as sequências de nucleótidos dos genes de sintetase da quitina das três classes foram comparadas e utilizadas para construir as respectivas árvores filogenéticas (Figs. 17, 18 e 19).

Calcularam-se as distâncias (percentagem de divergência) entre todos os pares de sequências de um alinhamento múltiplo aplicando-se, posteriormente, o método Neighbour-Joining (Saitou and Nei, 1987) à matriz de distâncias, de forma a obter uma árvore sem raiz. Usando um “outgroup” (sequência que agrupa fora da árvore), para cada classe, obteve-se as raízes das árvores. A visualização e arranjo gráfico das árvores foram efectuados com recurso ao programa TREEVIEW.

Foi, igualmente, realizada uma análise “bootstrap” de forma a validar os grupos formados nas árvores. Na construção das árvores filogenéticas foram efectuadas 1000 réplicas de “bootstrap”. Este método deriva valores de confiança para os grupos das árvores, e consiste em realizar N amostras ao acaso dos locais do alinhamento, gerando N árvores (1 por cada amostra) e contar quantas vezes cada grupo da árvore original ocorre nas árvores amostra (Alves, 2001).

A análise da árvore filogenética permite distinguir vários grupos taxonómicos, já de algum modo evidenciado no dendrograma obtido anteriormente.

Observando as árvores filogenéticas das três classes, foi possível verificar que os fragmentos de ambas as espécies de *Botryosphaeria* não se incluem em qualquer dos grupos taxonómicos, ficando individualizados num ramo distinto dos restantes. Este ramo corresponde à ordem Botryosphaeriales, família Botryosphaeriaceae. Apenas a análise de sequências de sintetases de quitina de classe I não permitiu uma distinção clara entre as espécies *B. dothidea* e *B. corticis*.

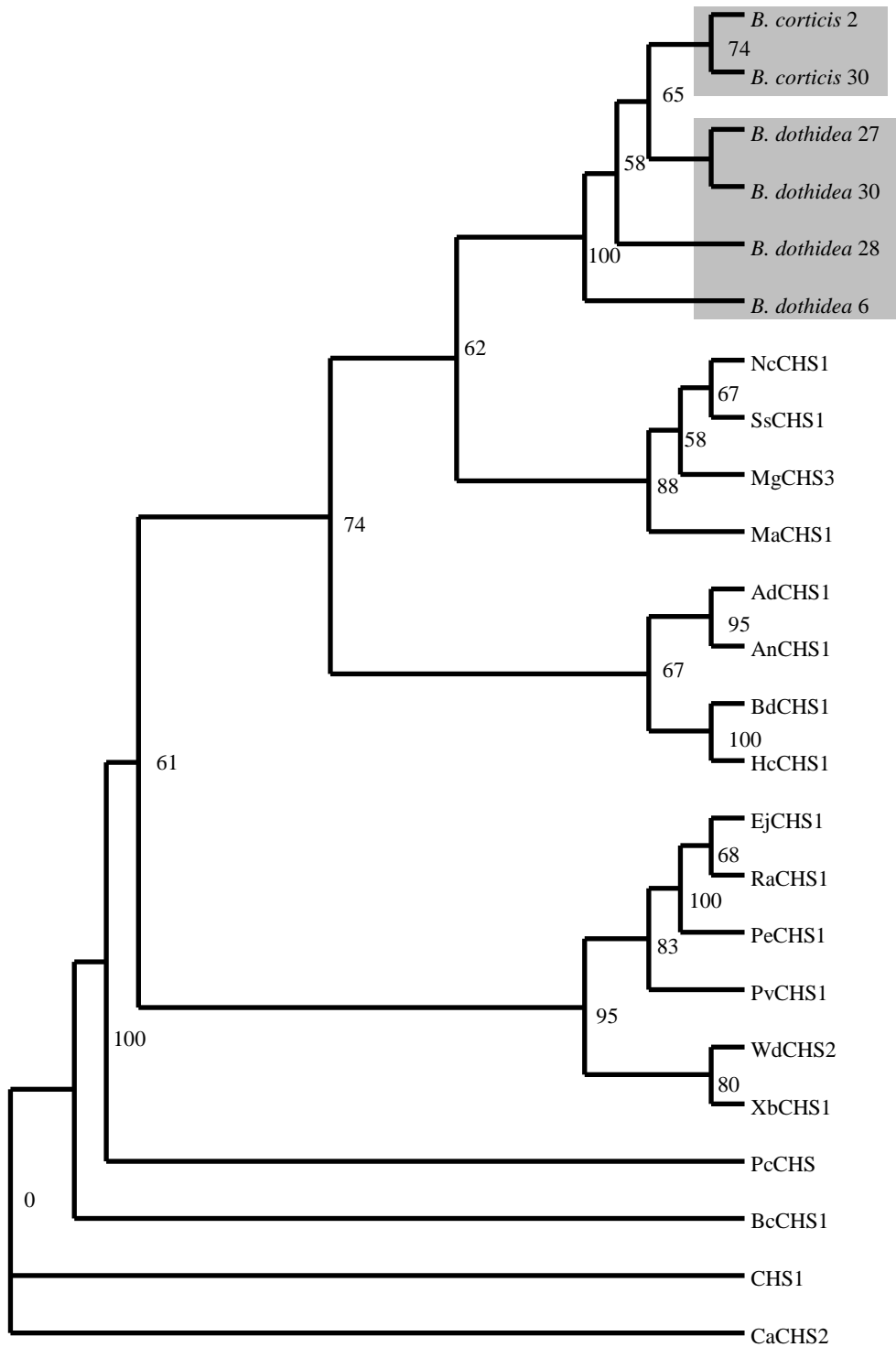


Figura 17. Árvore filogenética derivada das sequências de nucleótidos de fragmentos de sintetase da quitina de classe I de diferentes espécies de fungos e dos fragmentos de *B. dothidea* e *B. corticis* de classe I. A sequência CHS1 de *S. cerevisiae* foi utilizada como “outgroup”.

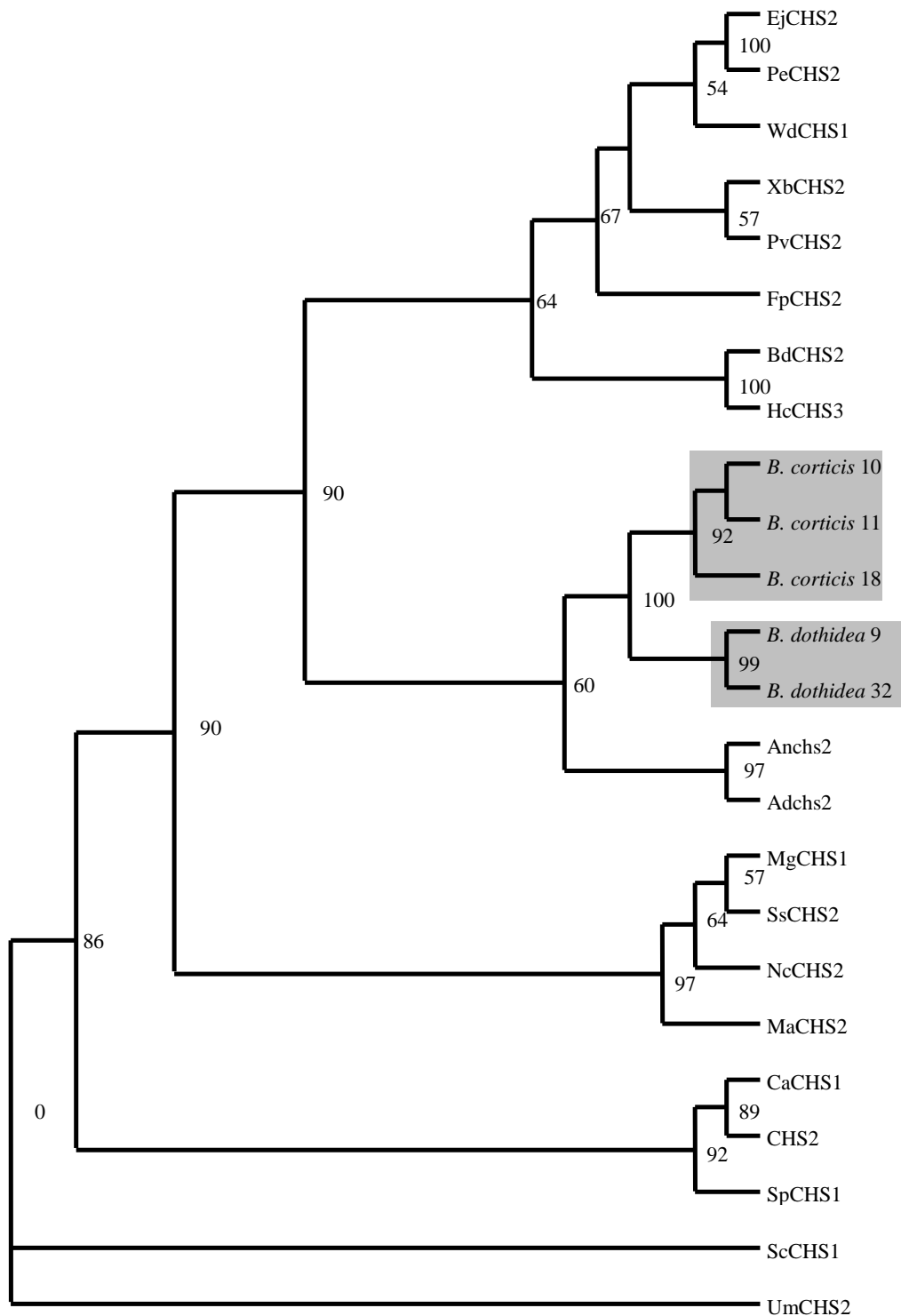


Figura 18. Árvore filogenética derivada das sequências de nucleótidos de fragmentos de sintetase da quitina de classe II de diferentes espécies de fungos e dos fragmentos de *B. dothidea* e *B. corticis* de classe II. A sequência UmCHS2 de *U. maydis* foi utilizada como “outgroup”.

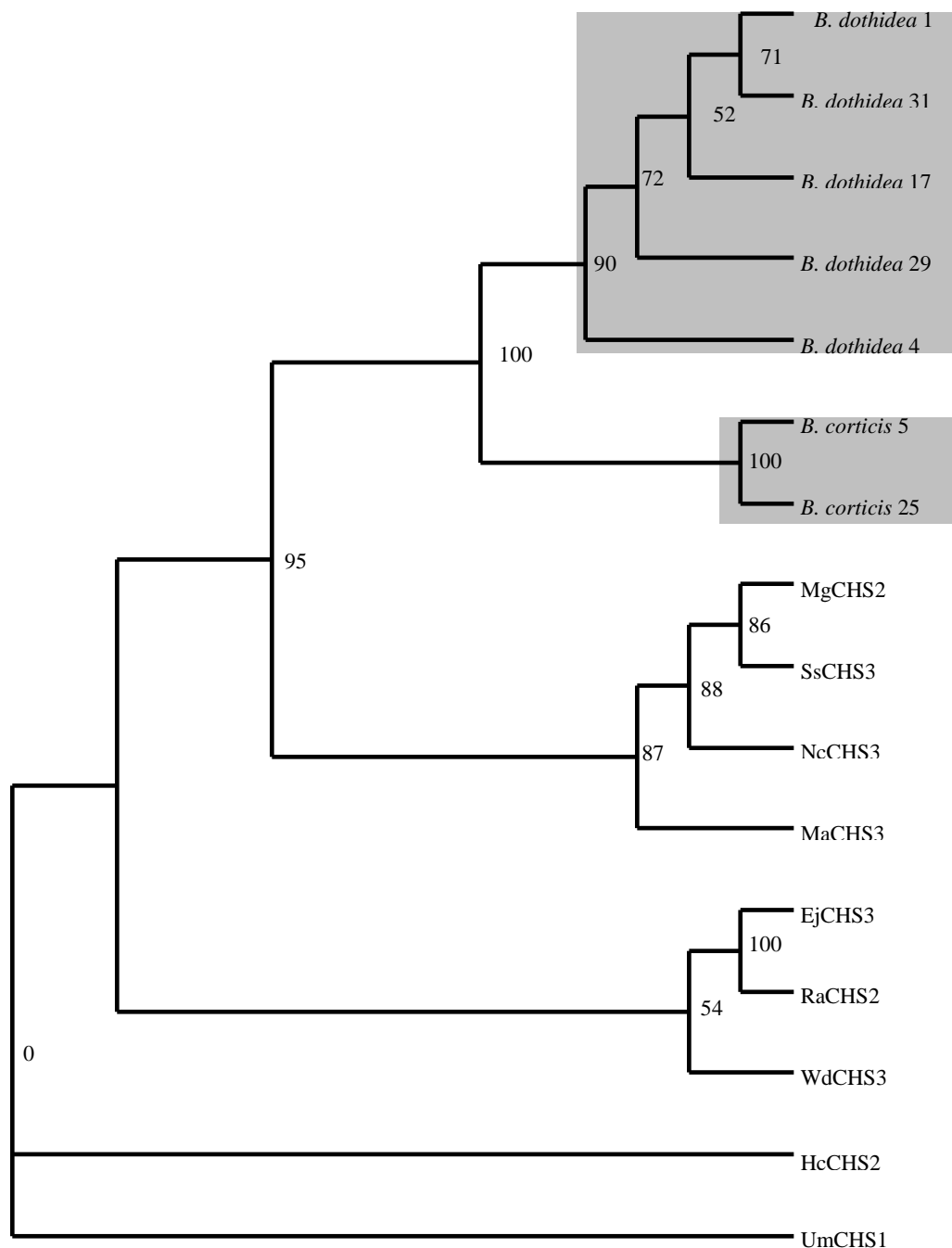


Figura 19. Árvore filogenética derivada das sequências de nucleótidos de fragmentos de sintetase da quitina de classe III de diferentes espécies de fungos e dos fragmentos de *B. dothidea* e *B. corticis* de classe III. A sequência UmCHS1 de *U. maydis* foi utilizada como “outgroup”.

3.8 Hibridação

Com o objectivo de verificar a presença de sequências homólogas ao gene de sintetase da quitina nas estirpes de *Botryosphaeria* (CBS113191, CBS119047, CBS119048 e CBS115476), foi realizada uma hibridação utilizando como sondas 3 clones já sequenciados, cada um pertencente a uma classe de sintetase da quitina (I, II e III). O DNA genómico das 4 estirpes foi digerido com recurso à enzima *Hind*III e a hibridação decorreu a uma temperatura de 42°C na presença de 50% de formamida.

Após hibridação, foram detectados fragmentos *Hind*III em todas as estirpes testadas, para as três classes de sondas (Fig. 20). Tal facto indica a presença de sequências homólogas do gene que codifica para a sintetase da quitina nas quatro estirpes. Para cada classe foi identificado em todas as estirpes um só fragmento por hibridação.

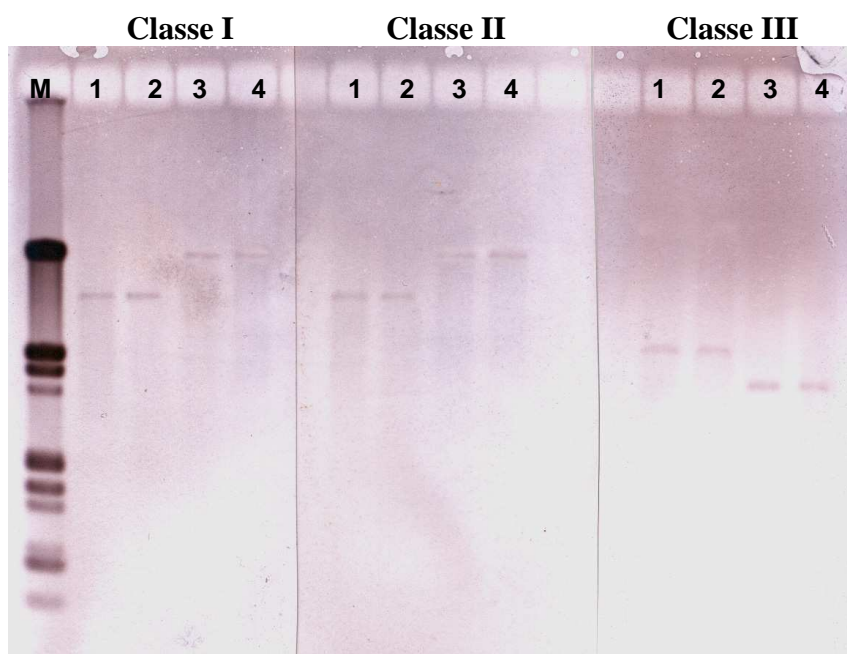


Figura 20. Detecção por hibridação de fragmentos homólogos do gene que codifica para sintetase da quitina de classe I, II e III. M – DNA do fago λ digerido com *Eco*RI e *Hind*III, 1 – CBS115476, 2 – CBS113191, 3 – CBS119047 e 4 – CBS119048.

4. Discussão

Com auxílio de “primers” degenerados, descritos por Bowen *et al.* (1992) foram amplificados dois fragmentos de genes que codificam para a sintetase da quitina, um de *B. dothidea* e outro de *B. corticis*. Estes “primers” permitem amplificar fragmentos de sintetases da quitina de diferentes classes, com exactamente o mesmo tamanho (Alves, 2001).

A análise do gel de agarose dos produtos de amplificação revelou a presença de dois fragmentos de aproximadamente 600 pb. Após clonagem e sequenciação dos clones de ambas as espécies de *Botryosphaeria* procedeu-se à análise das sequências nucleotídicas e de a.a. deduzidas destes fragmentos (Fig. 12), que revelaram uma elevada percentagem de identidade com sintetases da quitina de outros fungos (programa BLAST).

Bowen e seus colaboradores (1992) identificaram três classes de sintetases da quitina (I, II e III). No entanto, em estudos posteriores, outras classes foram descritas (Choquer *et al.*, 2004).

Usando o programa Clustal W2, alinharam-se as sequências nucleotídicas (Fig. 15) e de a.a. deduzidas (Fig. 16), verificando-se que apresentam uma grande identidade entre si. Algumas diferenças observadas entre sequências pertencentes à mesma classe e dentro da mesma espécie correspondem a substituições conservativas e semi-conservativas e outras a substituições pontuais de alguns a.a. (classe I e III). Tal facto pode ser indicativo da existência de várias cópias de genes de CHS (relacionados com as classes I e III) no genoma de *Botryosphaeria*, como é o caso de *A. fumigatus* que apresenta quatro genes para a sintetase da quitina de classe III (Namgung *et al.*, 1996).

As sequências de a.a. deduzidas, tanto de *B. dothidea* como de *B. corticis*, foram alinhadas com outras sequências de a.a. de sintetases da quitina de outros fungos (Fig. 13) depositadas no GenBank. Com uma mera inspecção visual do alinhamento das várias sequências de a.a. podemos verificar a existência de três classes de sintetase da quitina (I, II e III). Deste modo, pode-se observar que, relativamente a *B. dothidea*, os clones 9 e 32 pertencem à classe II, os clones 6, 27, 28 e 30 à classe I e os clones 1, 4, 17, 29 e 31 à classe III. Quanto a *B. corticis*, os clones 10, 11 e 18 pertencem à classe II, os clones 2 e 30 à classe I e os clones 5 e 25 à classe III. É possível que estas espécies possuam sintetases da quitina de outras classes, no entanto, os “primers” utilizados não permitem amplificá-las (Alves, 2001).

Com exceção do fragmento CHS1 (sequência “outgroup”), todos os outros fragmentos se inserem numa das três classes, que representam três grupos funcionais distintos (Bowen *et al.*, 1992). Ruíz-Herrera e seus colaboradores identificaram duas divisões entre as classes de CHS conhecidas, sendo que as classes I, II e III pertencem à divisão 1 e caracterizam-se por serem proteínas pequenas que podem ter 738 a 1131 resíduos de a.a.

Analisando o dendograma (Fig. 14) é possível distinguir as diferentes classes de sintetases da quitina, pois, as sequências pertencentes a cada classe, agrupam-se conjuntamente em ramos diferentes.

Aparentemente, as classes I e II estão presentes em leveduras e fungos filamentosos, no entanto a classe III é exclusiva dos fungos filamentosos (Roncero, 2002).

As sequências de fragmentos de sintetases da quitina têm sido utilizadas para deduzir possíveis filogenias (Bowen *et al.*, 1992; Alves *et al.*, 2001). Estas estão, geralmente, de acordo com filogenias derivadas por caracteres morfológicos, ou mesmo pela análise de sequências de outros genes, nomeadamente dos genes ribossomais (Alves, 2001).

As relações filogenéticas entre as duas espécies em estudo (*B. dothidea* e *B. corticis*) e outros fungos registados no GenBank (Anexo I) foram analisadas através da construção de um filograma para cada classe, com as respectivas sequências de nucleótidos dos fragmentos de sintetase de quitina. Pela análise filogenética é possível observar a separação dos fungos em grupos taxonómicos distintos, de tal forma que o género *Botryosphaeria* forma um grupo separado que corresponde à ordem *Botryosphaeriales*.

Na árvore filogenética de CHS classe I (Fig. 17) em que o fragmento CHS1 foi usado como “outgroup”, podemos observar que tanto *B. dothidea* como *B. corticis* agrupam num ramo distinto, cujo suporte de “bootstrap” como grupo filogenético é de 100%, porém não existe uma clara diferenciação entre as duas espécies.

Relativamente à árvore filogenética de CHS classe II (Fig. 18), em que foi utilizado o fragmento UmCHS2 como “outgroup”, verifica-se que, de igual modo, as duas espécies de *Botryosphaeria* agrupam no mesmo ramo com um limite de confiança como grupo de 100%, todavia nesta árvore é possível fazer uma distinção entre as duas espécies de forma a observar uma diferenciação genética entre ambas. Observa-se que *B. corticis*10, *B. corticis*11 e *B. corticis*18 agrupam conjuntamente em 920 das 1000 réplicas, o que lhes confere um limite de confiança de “bootstrap” como grupo filogenético de 92% e *B.*

*dothidea*9 e *B. dothidea*32 agrupam conjuntamente em 990 das 1000 réplicas, o que lhes confere um limite de confiança como grupo filogenético de 99%.

Quanto à árvore filogenética de CHS classe III (Fig. 19), cujo “outgroup” é o fragmento UmCHS1, pode-se inferir, do mesmo modo, que ambas as espécies de *Botryosphaeria* agrupam no mesmo ramo com um limite de confiança de 100%, assim como a existência de outros dois grupos que correspondem à distinção evolutiva entre *B. dothidea* e *B. corticis*. É possível observar uma diferenciação genética entre estas duas espécies, de tal forma que *B. dothidea*1, *B. dothidea*31, *B. dothidea*17, *B. dothidea*29 e *B. dothidea*4 agrupam conjuntamente, apresentando um limite de confiança de “bootstrap” como grupo filogenético de 90% e da mesma forma *B. corticis*5 e *B. corticis*25 apresentam um limite de confiança como grupo de 100%.

O facto de não haver sequências disponíveis de outras espécies de fungos filogeneticamente próximos de *Botryosphaeria* limita, de certa forma, a análise filogenética apresentada. Seria de grande interesse obter algumas dessas sequências para futuras análises filogenéticas.

Por hibridação pretendeu-se detectar fragmentos homólogos ao gene de sintetase da quitina em quatro estirpes de *Botryosphaeria*, sendo as sondas 3 clones já sequenciados, cada um pertencente a uma classe de sintetase da quitina (I, II e III).

Após observação da figura 20, podemos verificar que em ambas as espécies de *Botryosphaeria*, para as três classes, ocorre um sinal de hibridação fraco com o DNA genómico digerido. Desta forma é possível verificar a presença de fragmentos homólogos ao fragmento de sintetase da quitina nas estirpes de *Botryosphaeria* testadas. Tal facto sugere que os genes que codificam para as três classes de CHS’s apresentam cópia única no genoma do fungo, no entanto estes resultados contrariam os obtidos pela sequenciação que indicam a presença de várias cópias no genoma. Esta contradição pode ser devida a alguns factores: erros ocorridos durante a hibridação ou erros introduzidos pela *Taq* durante a amplificação, apesar da taxa de erro desta enzima ser muito baixa.

Para uma melhor compreensão do número de cópias destes genes seria de interesse a análise da expressão destes genes. Através da análise do mRNA seria possível verificar a existência (ou não) de diferentes cópias.

De futuro seria interessante alargar este estudo às restantes classes de sintetase da quitina (IV, V) dentro do mesmo género, assim como a análise destes genes em conjunto

com dados de sequências mais extensos poderá ser útil na análise de relações evolutivas entre fungos. Do mesmo modo, poderá ser feita a análise de experiências de disrupção génica, de forma a determinar as funções das múltiplas sintetases da quitina e perceber o seu contributo no desenvolvimento da parede celular destes fungos.

5. Conclusões

A análise do presente trabalho permitiu retirar as seguintes conclusões relativamente ao género *Botryosphaeria*:

- ❖ as sequências de nucleótidos obtidas revelaram elevada taxa de identidade com sequências de sintetases da quitina de outros fungos;
- ❖ o género *Botryosphaeria* possui sintetases de quitina pertencentes a pelo menos 3 classes distintas, nomeadamente classe I, II e III;
- ❖ a análise filogenética permite a separação dos fungos em grupos taxonómicos diferentes em que o género *Botryosphaeria* forma um grupo separado de todos os outros;
- ❖ as sequências de sintetase de quitina de classe II e III revelam potencial como marcador filogenético ao nível da espécie;
- ❖ devido aos resultados contraditórios entre sequenciação e hibridação, não é claro se o genoma de *Botryosphaeria* spp. apresenta cópia única ou múltiplas cópias dos genes de CHS das diferentes classes.

6. Bibliografia

Alves, A. 2001. Caracterização fenotípica e genotípica de estirpes de fungos fitopatogénicos do género *Phaeoacremonium*. Universidade de Aveiro. 146p.

Alves, A., Philips, A.J.L., Henriques, I. and Correia, A. 2007. Rapid differentiation of species of *Botryosphaeriaceae* by PCR fingerprinting. *Research in Microbiology* 158: 112-121.

Arruda, R.L.V.S., Gonçalves, A.N. and Krüger, Tasso L. 1998. Estado nutricional de *Eucalyptus citriodora* Hook cultivado sob diferentes doses de boro e sua relação com a agressividade de *Botryosphaeria ribis*. *Scientia Forestalis* 53: 57-70.

Andriole V.T. 1999. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44: 151-162.

Banks, I.R., Specht, C.A., Donlin, M.J., Gerik, K.J., Levitz, S.M. and Lodge, J.K. 2005. A Chitin Synthase and Its Regulator Protein Are Critical for Chitosan Production and Growth of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 4: 1902-1912.

Barbosa, A.M., Steluti, R.M., Dekker, R.F.H, Cardoso, M.S. and Silva, M.L.C. 2003. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1-3; 1-6)- β -D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. *Carbohydrate Research* 338: 1691-1698.

Bowen, A.R., Chen-Wu, J.L., Momany, M., Young, R., Szaniszlo, P.J. and Robbins, P.W. 1992. Classification of fungal chitin synthases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:519–523.

Bowman, S. M. and Free S. J. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* 28(8): 799-808.

Cabib, E., Roberts, R. and Bower, B. 1982. Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. *Annual Review of Biochemistry* 51:763-93.

- Cabib, E., Sburlati, A., Bowers, B. and Silverman, S. J.** 1989. Chitin synthase 1, an auxiliary enzyme for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* 108:1665–1672.
- Campana-Filho, S.P., Britto, D., Curti, E., Abreu, F.R., Cardoso, M.B., Battisti, M.V., Sim, P.C., Goy, R.C., Signini, R. and Lavall, R.L.** 2007. Extracção, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. *Química Nova* 30: 644-650.
- Choquer, M., Boccara, M., Gonçalves, I.R., Soulié, M. and Vidal-Cros, A.** 2004. Survey of the *Botrytis cinérea* chitin synthase multigenic family through the analysis of six euascomycetes genomes. *European Journal of Biochemistry* 271: 2153-2164.
- Cohen, E.** 2001. Chitin Synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Management Science* 57: 946-950.
- Crous, P W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder, J., Marasas, W.F.O., Philips, A.J.L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P. and Groenewald, J.Z.** 2006. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in Mycology* 55: 235-253.
- Hintz, W.E.** 1999. Sequence analysis of the chitin synthase A gene of the Dutch elm pathogen *Ophiostoma novo-ulmi* indicates a close association with the human pathogen *Sporothrix schenckii*. *Gene* 237(1): 215-21.
- Marchi, C.M., de Freitas Borges, M. and Brommonschekel, S.H.** 2006. Obtenção de Protoplastos de *Botryosphaeria* sp. *Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde, Ponta Grossa* 12 (4): 23-32.
- Martín-Urdíroz, M., Roncero, M.I.G., González-Reyes, A.G. and Ruiz-Roldán, C.** 2008. ChsVb, a class VII chitin synthase involved in septation, is critical for pathogenicity in *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell* 7: 112-121.

- Mehamann, B., Brunner, I. and Braus, G.H.** 1994. Nucleotide Sequence Variation of Chitin Synthase Genes among Ectomycorrhizal Fungi and Its Potencial Use in Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (9): 3105-3111.
- Merzendorfer, H. and Zimoch, L.** 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology* 206: 4393–4412.
- Merzendorfer, H.** 2005. Insect chitin synthases: a review. *Journal of Comparative Physiology, B* 176(1):1-15.
- Mio, T., Yabe, T., Sudoh, M., Satoh, Y., Nakajima, T., Arisawa, M. And Yamada-Okabe, H.** 1996. Role of three chitin synthase genes in the growth of *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology* 178: 2416-2419.
- Namgung, J., Park, B.C., Lee, D.H., Bae, K.S., Park, Hee-Moon.** 1996. Cloning and characterization of chitin synthase gene fragments from *Penicillium chrysogenum*. *FEMS Microbiology Letters* 145: 71-76.
- Pontón, J.** 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología* 25: 78-82.
- Rosa, D.D., de Marque, J.M., Fenille, R.C., de Souza, N.L. and Kuramae, E.E.** 2003. Análise filogenética de *Phytophthora capsici* Leonian do Estado de São Paulo baseada na sequência de nucleotídeos da região ITS-5.8S rDNA. *Acta Scientiarum Biological Sciences* 25 (2): 429-434.
- Riquelme, M. and Bartnicki-García, S.** 2008. Advances in understanding hyphal morphogenesis: Ontogeny, phylogeny and cellular localization of chitin synthases. *Fungal Biology Reviews* 22: 56–70.

Rocero, C. 2002. The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Current Genetics* 41: 367-378.

Ruiz-Herrera, J., González-Prieto, J.M. and Ruiz-Medrano, R. 2002. Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthases from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Research* 1: 247-256.

Saldanha, R.L., Garcia, J.E., Dekker, R.F.H., Vilas-Boas, L.,A. and Barbosa, A.M. 2007. Genetic diversity among *Botryosphaeria* isolates and their correlation with cell wall-lytic enzyme production. *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 259-264.

Saitou, N. and Nei, M. 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology Evolution* 4 (4): 406-425.

Shaw, J. A., Mol, P.C., Bowers, B., Silverman, S.J., Valdivieso, M.H., Duran, A. and Cabib, E. 1991. The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Journal of Cell Biology* 114:111–123.

Slippers, B. and Wingfield, M.J. 2007. *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews* 21:90–106.

Swofford DL. 2003. **PAUP***. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods) Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Úrbez-Torres, J.R., Leavitt, G.M., Voegel, T.M., and Gubler, W.D. 2006. Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease*. 90:1490-1503.

Van Dellen, K.L., Bulik, D.A., Specht, C.A., Robbins, P.W. and Samuelson, J.C. 2005. Heterologous Expression of an *Entamoeba histolytica* Chitin Synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* 5: 203-206.